

Etude de la synthèse et de la biosynthèse de quelques pigments de champignons inférieurs

THESE

présentée à la Faculté des sciences de l'Université de Genève
pour obtenir le grade de docteur ès sciences chimiques

par

Eric STEINER

du

GRAND-SACONNEX (Genève)

Thèse N° 1674

GENEVE

Editions Médecine et Hygiène

1974



Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41545917_0006

UNIVERSITE DE GENEVE

FACULTE DES SCIENCES

Professeurs

Th. POSTERNAK

E. CHAROLLAIS

chargé de cours

Département de biochimie

Etude de la synthèse et de la biosynthèse de quelques pigments de champignons inférieurs

THESE

présentée à la Faculté des sciences de l'Université de Genève
pour obtenir le grade de docteur ès sciences chimiques

par

Eric STEINER

du

GRAND-SACONNEX (Genève)

Thèse N° 1674

GENEVE

Editions Médecine et Hygiène

1974

La Faculté des sciences, sur le préavis du professeur ordinaire Th. Posternak et du chargé de cours E. Charollais, co-directeurs et du professeur ordinaire K. Schaffner (Faculté des sciences), autorise l'impression de la présente thèse, sans exprimer d'opinion sur les propositions qui y sont énoncées.

Genève, le 12 juillet 1974

Le doyen :
Jean Muller

Thèse 1674



Ce travail a été réalisé au Laboratoire de chimie biologique et organique spéciale de la Faculté des sciences de l'Université de Genève, sous la direction du docteur E. Charollais, chargé de cours.

Qu'il me soit permis de remercier ici très sincèrement le docteur Charollais, qui a suivi ce travail avec un grand intérêt, et qui m'a fait bénéficier de ses précieux conseils.

Je tiens aussi à exprimer toute ma reconnaissance au professeur Th. Posternak, directeur du Laboratoire, grâce à qui j'ai pu entreprendre ce travail et qui m'a fait profiter de sa longue expérience dans le domaine de ces pigments.

Je remercie encore le professeur K. Schaffner, qui a aimablement accepté de faire partie du jury de cette thèse, ainsi que toutes les personnes qui, par l'aide très précieuse qu'elles m'ont apportée, ou l'ambiance qu'elles ont créée au laboratoire, ont apporté leur contribution à la réalisation de ce travail.

A VERONIQUE

VERONIQUE, I AM WRITING TO YOU BECAUSE I HAVE BEEN THINKING OF YOU A LOT LATELY. I HAVE BEEN THINKING OF YOU A LOT LATELY.

I HAVE BEEN THINKING OF YOU A LOT LATELY. I HAVE BEEN THINKING OF YOU A LOT LATELY. I HAVE BEEN THINKING OF YOU A LOT LATELY.

I HAVE BEEN THINKING OF YOU A LOT LATELY. I HAVE BEEN THINKING OF YOU A LOT LATELY. I HAVE BEEN THINKING OF YOU A LOT LATELY.

I HAVE BEEN THINKING OF YOU A LOT LATELY. I HAVE BEEN THINKING OF YOU A LOT LATELY. I HAVE BEEN THINKING OF YOU A LOT LATELY.



TABLE DES MATIERES

	Page
INTRODUCTION	1
PREMIERE PARTIE	4
1. Schémas de synthèse	5
1.1. Introduction	5
1.2. Schémas de synthèse des précurseurs	7
1.2.1. Acétoacétate de lithium	7
1.2.2. Orcinol	7
1.2.3. Aldéhyde orsellinique	7
1.2.4. Acide orsellinique	8
1.2.5. Acide hydroxyorsellinique	8
1.2.6. 2,3,5-trihydroxytoluène	9
1.2.7. 2,3,5,6-tétrahydroxytoluène	10
1.2.8. 2,6,2',6'-tétrahydroxy-4,4'-diméthyl-biphényl	11
1.2.8.1. 4-iododiméthylorcine	
1.2.8.2. 2,6,2',6'-tétrahydroxy-4,4'-diméthyl-biphényl	12
1.2.9. Acide 2,6,2',6'-tétrahydroxy-4,4'-diméthyl-biphényl-3,3'-dicarboxylique	12
1.3. Schémas de synthèse des pigments	14
1.3.1. Introduction	14
1.3.2. Schéma de synthèse de la phoenicine	14
1.3.3. Schéma de synthèse de l'oosporéine, de la pyxiférine et de la 2,5,2',5'-tétrahydroxy-dibenzoquinone	15
2. Etude de quelques propriétés des dérivés de l'orcinol et des pigments	18
2.1. Constantes acide-base des pigments	18
2.1.1. Phoenicine	
2.1.2. Oosporéine, pyxiférine et tétrahydroxydibenzoquinone	19

2.2.	Spectres d'absorption UV-visible des pigments	20
2.3.	Spectres de résonance magnétique nucléaire	25
2.3.1.	Enregistrement des spectres	25
2.3.2.	Aspect théorique	25
2.4.	Chromatographie	32
3.	Partie expérimentale	34
3.1.	Introduction	34
3.2.	Acétoacétate de lithium	35
3.3.	Aldéhyde orsellinique	35
3.4.	Acide orsellinique	35
3.5.	Orcinol	36
3.5.1.	Voie A	36
3.5.2.	Voie B	36
3.5.2.1.	Diméthylorcine	36
3.5.2.2.	Orcinol	37
3.6.	2,3,5-trihydroxytoluène	37
3.6.1.	Voie A	37
3.6.2.	Voie B	38
3.6.2.1.	Préparation du produit de départ	38
3.6.2.2.	2,3,5-triméthoxytoluène	38
3.6.2.3.	2,3,5-trihydroxytoluène	39
3.7.	Acide hydroxyorsellinique	39
3.7.1.	Voie A	39
3.7.2.	Voie B	40
3.7.2.1.	3,4,6-triméthoxytolualdéhyde	40
3.7.2.2.	Acide 3,4,6-triméthoxytoluique	41
3.7.2.3.	Acide hydroxyorsellinique	41
3.8.	2,3,5,6-tétrahydroxytoluène	42
3.8.1.	1,2,4,5-tétrahydroxybenzène	42
3.8.2.	2,3,5,6-tétraméthoxytoluène	42
3.8.2.1.	Voie A	42
3.8.2.2.	Voie B	44
3.8.3.	2,3,5,6-tétrahydroxytoluène	44
3.8.3.1.	3,6-dihydroxytoluquinone	44
3.8.3.2.	2,3,5,6-tétrahydroxytoluène	45

III

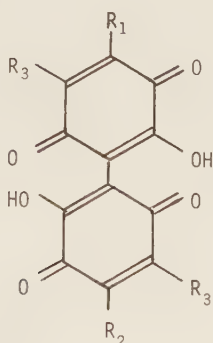
3.9.	2,6,2',6'-tétrahydroxy-4,4'-diméthyl-biphényl	46
3.9.1.	Essais préliminaires	46
3.9.2.	4-iododiméthylorcine par la voie A	47
3.9.2.1.	Réaction d'Hoffmann	47
3.9.2.2.	Réaction de Curtius	48
3.9.2.3.	Réaction de Schmidt	48
3.9.3.	4-iododiméthylorcine par la voie B	48
3.9.4.	Tétrahydroxybitolyl	49
3.10.	Acide 2,6,2',6'-tétrahydroxy-4,4'-diméthyl-biphényl-3,3'-dicarboxylique	49
3.10.1.	Voie A	49
3.10.2.	Voie B	50
3.10.2.1.	Diiodotétraméthoxybitolyl	50
3.10.2.2.	Acide tétraméthoxybitolyl-dicarboxylique	51
3.10.3.	Voie C	51
3.10.3.1.	Tétrahydroxybitolyl-dialdéhyde	51
3.10.3.2.	Tétraméthoxybitolyl-dialdéhyde	52
3.10.3.3.	Acide 2,6,2',6'-tétraméthoxy-4,4'-diméthyl-biphényl-3,3'-dicarboxylique	52
3.10.3.4.	Acide 2,6,2',6'-tétrahydroxy-4,4'-diméthyl-biphényl-3,3'-dicarboxylique	53
3.11.	Phoenicine	54
3.12.	Oosporéine, 2,5,2',5'-tétrahydroxy-4-méthyl-dibenzoquinone, 2,5,2',5'-tétrahydroxy-dibenzoquinone	54
3.12.1.	1-iodo-2,3,5,6-tétraméthoxybenzène, 4-iodo-2,3,5,6-tétraméthoxytoluène	54
3.12.2.	2,3,5,6,2',3',5',6'-octaméthoxybiphényl, 2,3,5,6,2',3',5',6'-octaméthoxy-4-méthyl-biphényl, 2,3,5,6,2',3',5',6'-octaméthoxy-4,4',-diméthyl-biphényl	55
3.12.3.	Oosporéine, 2,5,2',5'-tétrahydroxy-4-méthyl-dibenzoquinone, 2,5,2',5'-tétrahydroxy-dibenzoquinone	56

	DEUXIEME PARTIE	59
1.	Introduction	60
2.	Conditions de culture des microorganismes	61
2.1.	Culture de <i>Penicillium phoeniceum</i>	61
2.2.	Culture de <i>Chaetomium aureum</i>	61
3.	Extraction et dosage des pigments	65
3.1.	Phoenicine	65
3.2.	Oosporéine	66
4.	Comptage des produits marqués	66
5.	Préparation des précurseurs marqués	67
5.1.	Introduction	67
5.2.	Acétoacétate de lithium- $3\text{-}^{14}\text{C}$	67
5.3.	Orcinol- $3\text{-}^{14}\text{C}$	68
5.4.	Aldéhyde orsellinique- $2\text{-}^{14}\text{C}$	68
5.5.	Acide orsellinique- $2\text{-}^{14}\text{C}$	68
5.6.	2,3,5-trihydroxytoluène-méthyl- ^{14}C	68
5.7.	Acide hydroxyorsellinique-méthyl- ^{14}C	69
5.8.	3,6,-dihydroxytoluquinone-méthyl- ^{14}C	69
5.9.	Acide 2,6,2',6'-tétrahydroxy-4,4'-diméthyl- biphényl-3,3'-dicarboxylique-diméthyl- ^{14}C	70
5.10.	Acide orsellinique doublement marqué	71
6.	Essais d'incorporation	72
6.1.	Introduction des précurseurs	72
6.2.	Extraction et traitement des pigments	73
6.3.	Détermination des rendements d'incorporation	73
7.	Tableau des essais d'incorporation	

7.1.	Phoenicine	74
7.2.	Oosporéine	76
8.	Discussion des résultats	77
8.1.	Remarques générales	77
8.2.	Biosynthèse de la phoenicine	78
8.3.	Biosynthèse de l'oosporéine	81
	BIBLIOGRAPHIE	84

INTRODUCTION

On connaît actuellement plusieurs pigments diquinoniques polyhydroxylés d'origine fongique, de formule générale:



La PHOENICINE ($R_1 = R_2 = \text{CH}_3$, $R_3 = \text{H}$) a été isolée pour la première fois par Friedheim /1/ en 1933, à partir de milieux de culture de *Penicillium phoeniceum* van Beyma. Ce pigment a été également retrouvé chez un autre microorganisme, *Penicillium rubrum* Grasberger et Stoll /2/. Sa constitution a été établie et sa synthèse chimique a été effectuée par Posternak et col. /3, 4, 5/, puis par Musso et col. /6/.

L'OOSPOREINE ($R_1 = R_2 = \text{CH}_3$, $R_3 = \text{OH}$) a été trouvée pour la première fois par Kögl et col. /7/ dans des cultures d'*Oospora colorans* van Beyma. Depuis, on l'a isolée à partir de nombreux microorganismes: *Chaetomium aureum* Chivers, que nous avons utilisé pour nos travaux /8, 9/, *Acremonium* /10/, *Phlebia mellea* Overholts et *Phlebia albida* Fries /11/, *Verticillium psalliotae* Treschow /12/, et enfin *Beauveria bassiana* /13/.

La structure chimique a été démontrée par Kögl /7/, qui a effectué la transformation de la phoenicine en oosporéine par l'intermédiaire de quinones-imines, et la synthèse a été effectuée par le

couplage de dérivés lithiés de bis-(4,5-méthylènedioxybenzoquinones) avec un halogénure d'alkyle /14/.

On a décrit un pigment nommé PYXIFERINE, produit par un lichen indien, *Pyxine coccifera*, auquel on a attribué la structure:



Malheureusement, toutes nos tentatives pour obtenir un tiré à part de cette publication ayant échoué, nous ne connaissons pas les propriétés de ce pigment. Nous avons synthétisé un pigment ayant la structure proposée pour la pyxiférine, mais il nous a été impossible de procéder à une identification éventuelle avec le produit décrit par les auteurs indiens.

Les DIBOVIQUINONES enfin, analogues de l'oosporéine dont les groupes méthyle sont remplacés par des chaînes polyisopréniques de structure
$$-(CH_2-\overset{\overset{CH_3}{|}}{CH}-C=CH_2)_n-H$$
 et qui peuvent être symétriques ($R_1 = R_2: n = 4$) ou asymétriques ($R_1: n = 3, R_2: n = 4$), ont été récemment découvertes comme produits de biosynthèse de champignons supérieurs, *Gomphidius rutilus* et *Boletus bovinus* /16/.

Le but de ce travail est d'élucider la biosynthèse de la phoenicine et de l'oosporéine par l'étude de l'incorporation dans leur molécule de différents précurseurs possibles, marqués au moyen de ^{14}C et de tritium.

Quelques études fragmentaires de ces biosynthèses ont déjà été effectuées. En particulier, il a été bien établi que l'acétate est le produit de départ de la biosynthèse des deux pigments /9, 13, 17, 18/ et que, par la condensation de quatre molécules d'acétate, il se forme l'acide orsellinique, premier intermédiaire aromatique.

La première partie de ce travail est constituée par la mise au point des méthodes de synthèse des précurseurs par des réactions convenant bien au marquage isotopique, puis par la synthèse

chimique de l'oosporéine, de la pyxiférine, de la déméthyl-pyxiférine (inconnue dans la nature, $R_1 = R_2 = H$, $R_3 = OH$) et de la phoenicine, et enfin par l'étude de quelques propriétés des dérivés de l'orcinol que nous avons préparés.

Dans la seconde partie, nous avons établi par l'étude de l'incorporation des précurseurs radioactifs, une voie de biosynthèse à partir de l'acide orsellinique pour la phoenicine et l'oosporéine.

P R E M I E R E P A R T I E

Synthèse de quelques dérivés de l'orcinol et
du tétrahydroxybitolyl

Synthèse de la phoenicine, de l'oosporéine, de
la pyxiférine et de la déméthylpyxiférine

Etude de quelques propriétés physiques

1. SCHEMAS DE SYNTHESE

1.1. INTRODUCTION

Lors de la mise au point des synthèses des précurseurs, nous avons comme but final la synthèse de produits marqués. C'est pourquoi nous avons été guidés, dans notre choix des réactions, principalement par les trois conditions suivantes:

- a. Recherche de réactions chimiques ayant de bons rendements
- b. Recherche de voies de synthèse permettant l'introduction de la radioactivité au stade le plus avancé possible
- c. Recherche de manipulations simples.

Nous avons donc cherché en particulier de nouvelles méthodes de préparation de produits connus lorsque les méthodes décrites satisfaisaient mal aux conditions exposées ci-dessus. C'est pourquoi d'une part, nous avons préparé certains produits par plusieurs voies différentes, et d'autre part, nous avons abandonné certaines voies avant d'avoir obtenu le produit final quand nous nous sommes heurtés à des réactions difficiles.

La réaction qui s'est révélée la mieux adaptée à nos problèmes est la lithiation du noyau benzénique par le n-butyllithium, soit directement, soit à partir du dérivé halogéné, réaction qui s'est montrée spécifique à une exception près, et qui permet l'introduction de différents substituants, en particulier du groupe méthyle marqué, au moyen de $I^{14}CH_3$, et du tritium par réaction avec 3H_2O .

Pour chaque précurseur préparé, nous décrirons en détail la méthode adoptée pour la préparation du produit marqué. Lorsque les analyses et autres méthodes de caractérisation ont été faites sur un produit obtenu par une voie différente, nous décrirons également ces réactions, ainsi que les réactions qui, bien qu'ayant

été finalement abandonnées, nous ont conduits à préparer des produits nouveaux.

Les précurseurs qui ont été préparés et marqués au ^{14}C sont les suivants:

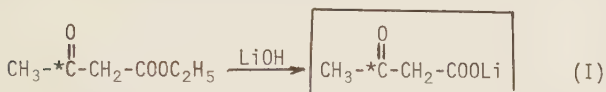
- I. Acétoacétate de lithium
- II. Orcinol
- III. Aldéhyde orsellinique
- IV. Acide orsellinique
- V. Acide hydroxyorsellinique
- VI. 2,3,5-trihydroxytoluène
- VII. 2,3,5,6-tétrahydroxytoluène
- VIII. Tétrahydroxybitolyl
- IX. Acide 4,4'-diméthyl-2,6,2',6'-tétrahydroxybiphényl-3,3'-dicarboxylique

Pour plus de commodité, le produit VII a été employé sous sa forme quinonique, car le polyphénol est très oxydable, même à l'état solide.

Dans les tableaux ci-dessous, nous indiquerons à côté du précurseur, dans le titre, l'origine du marquage (produit commercial ou préparé antérieurement dans notre laboratoire) et par * l'emplacement du marquage. Les voies de synthèse dont le dernier produit est encadré par un rectangle sont celles que nous avons choisies pour la préparation des produits marqués. Les produits dont le nom est souligné sont nouveaux et ont été caractérisés par différentes méthodes, analyse élémentaire, spectres de masse, de RMN, etc. Enfin, nous avons mis entre parenthèses les méthodes abandonnées.

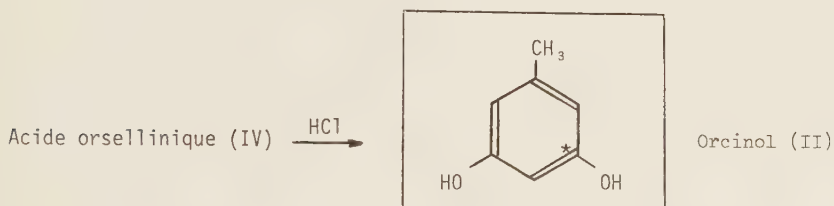
1.2. SCHEMAS DE SYNTHÈSE DES PRECURSEURS

1.2.1. Acétoacétate de lithium (I) (acétoacétate d'éthyle-3-¹⁴C)

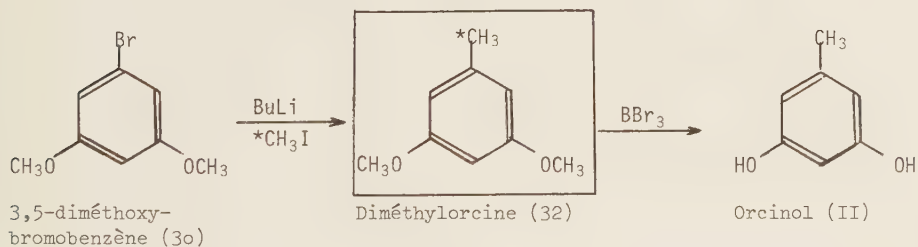


1.2.2. Orcinol (II)

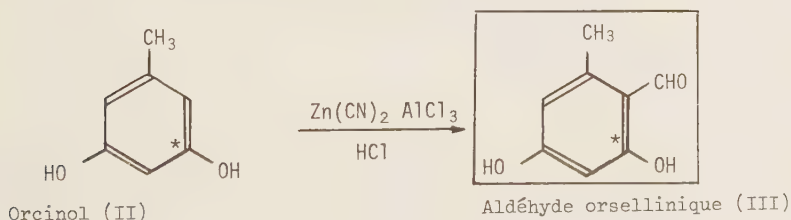
Voie A: (acide orsellinique-2-¹⁴C)



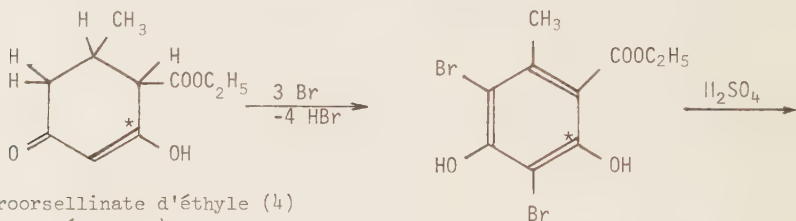
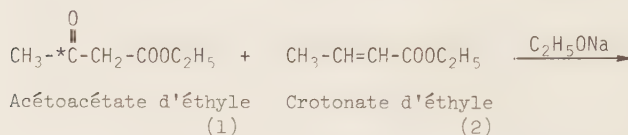
Voie B: (*CH₃I)



1.2.3. Aldéhyde orsellinique (III) (Orcinol-2-¹⁴C)

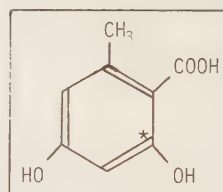
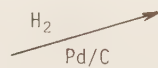
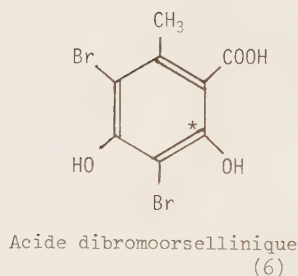


1.2.4. Acide orsellinique (IV) (acétoacétate d'éthyle-3-¹⁴C)

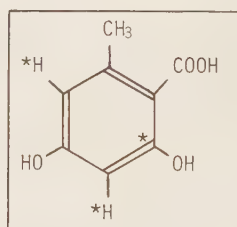


Dihydroorsellinate d'éthyle (4)
(forme de résonance)

Dibromoorsellinate d'éthyle (5)



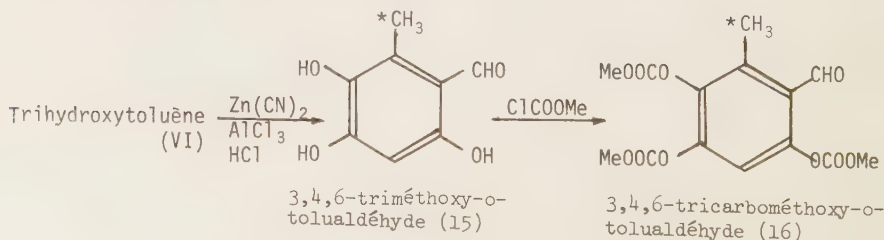
Acide orsellinique (IV)



Acide orsellinique-3,5-³H

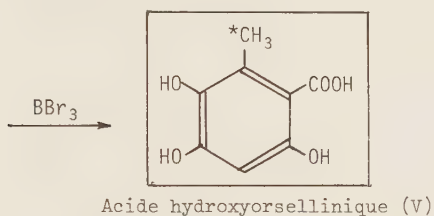
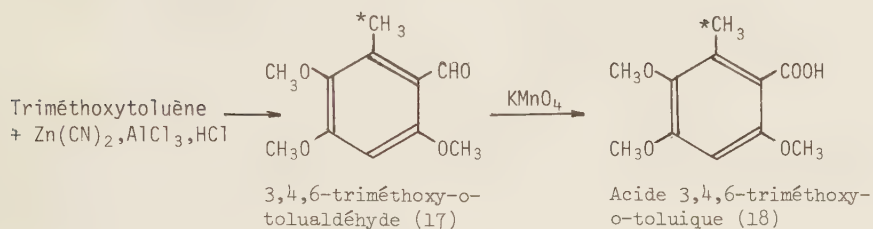
1.2.5. Acide hydroxyorsellinique (V)

Voie A: (Trihydroxytoluène)



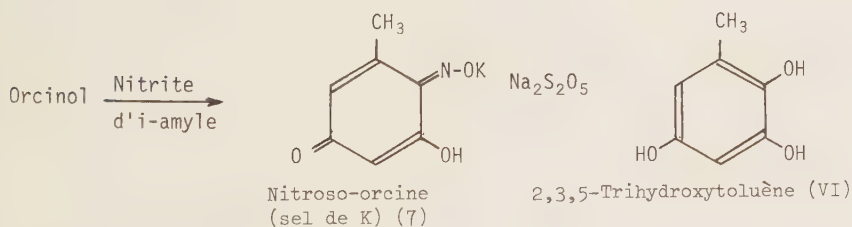


Voie B: (triméthoxytoluène)

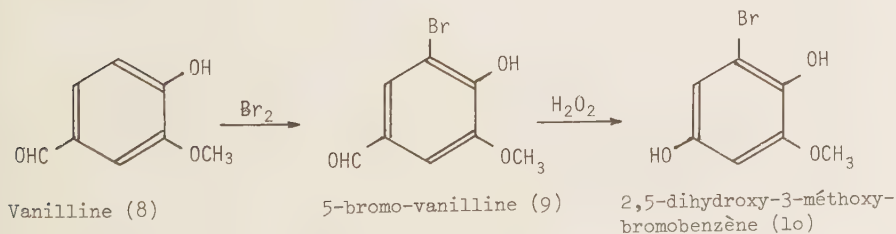


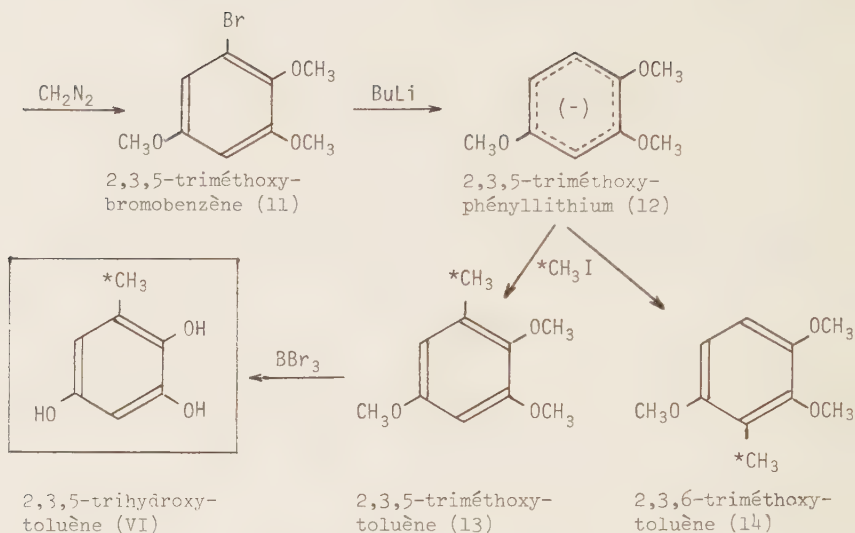
1.2.6. 2,3,5-trihydroxytoluène (VI)

Voie A: (Orcinol)

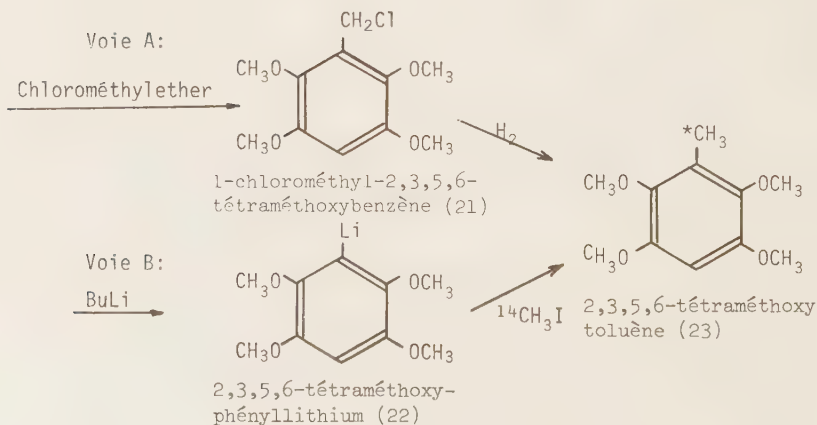
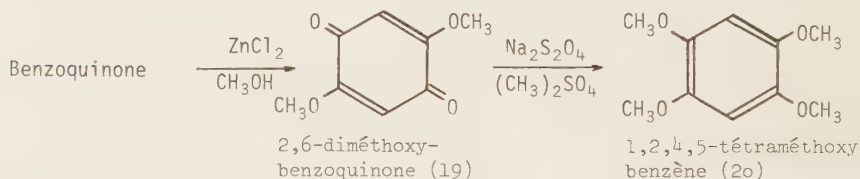


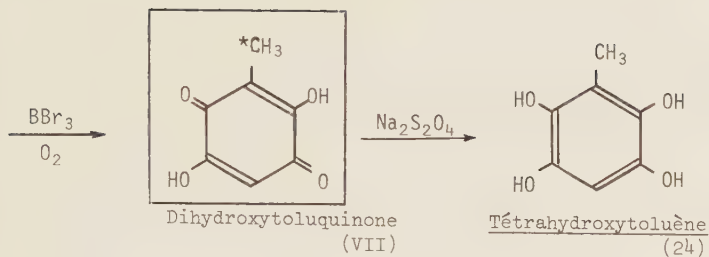
Voie B: ($^{14}\text{CH}_3\text{I}$)





1.2.7. 2,3,5,6-tétrahydroxytoluène (VII) ($^{14}\text{CH}_3\text{I}$)

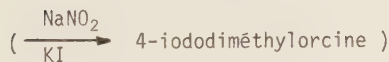
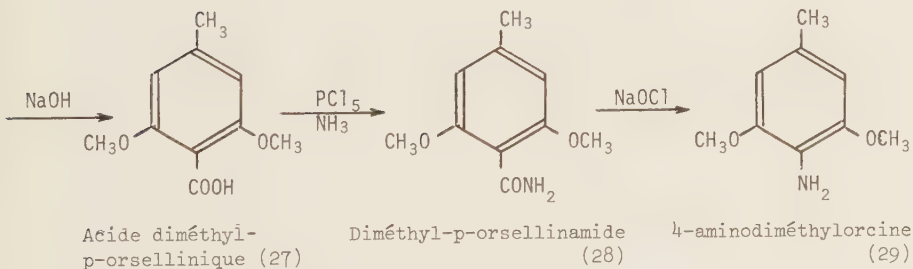
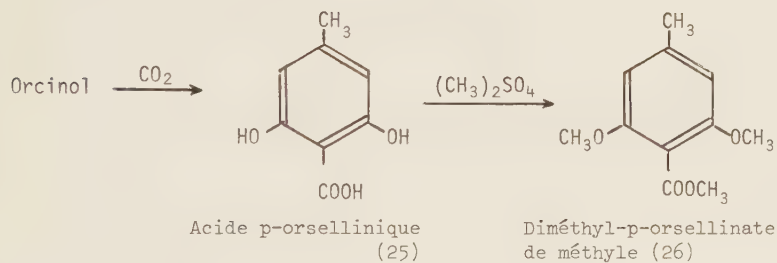




1.2.8. 2,6,2',6'-tétrahydroxy-4,4'-diméthyl-biphényl (Tétrahydroxybitolyl) (VIII)

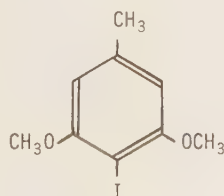
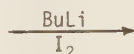
1.2.8.1. 4-iododiméthylorcine

Voie A: (Orcinol)



Voie B: (Diméthylorcine)

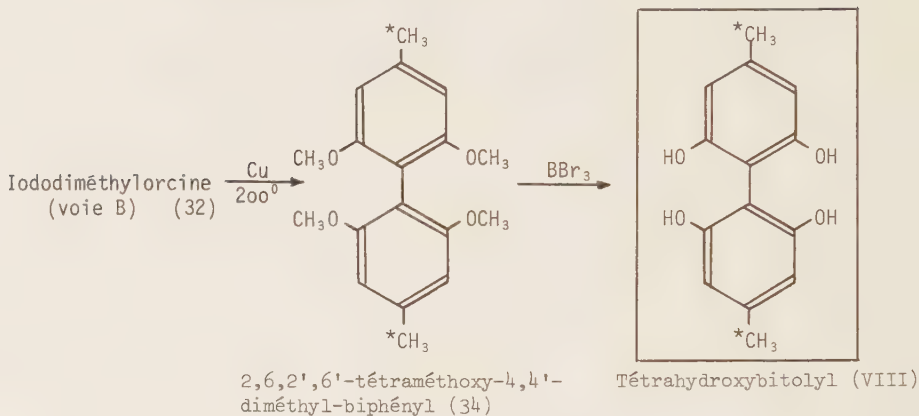
Diméthylorcine (32)
(Voir p. 7)



4-iododiméthylorcine (33)

1.2.8.2. 2,6,2',6'-tétrahydroxy-4,4'-diméthyl-biphényl

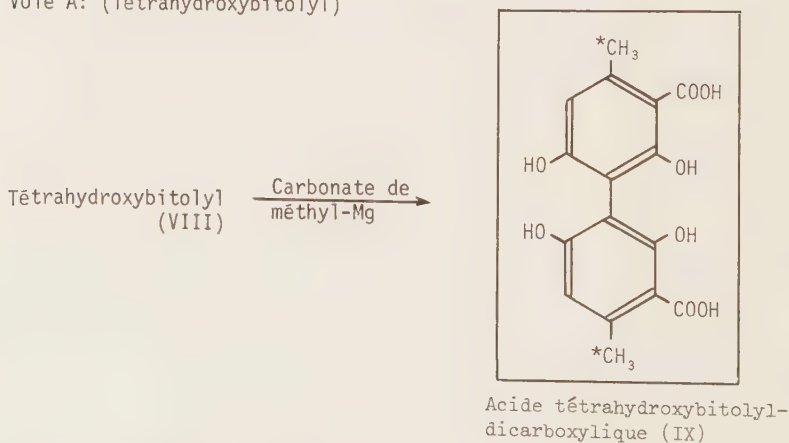
(Tétrahydroxybitolyl) (VIII)



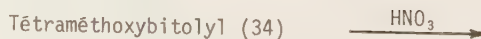
1.2.9. Acide 2,6,2',6'-tétrahydroxy-4,4'-diméthyl-biphényl-

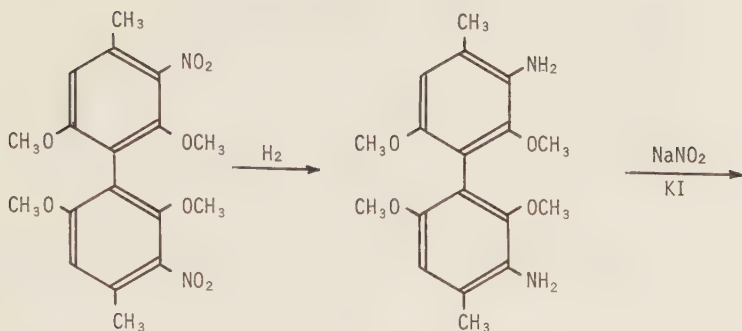
3,3'-dicarboxylique (IX)

Voie A: (Tétrahydroxybitolyl)



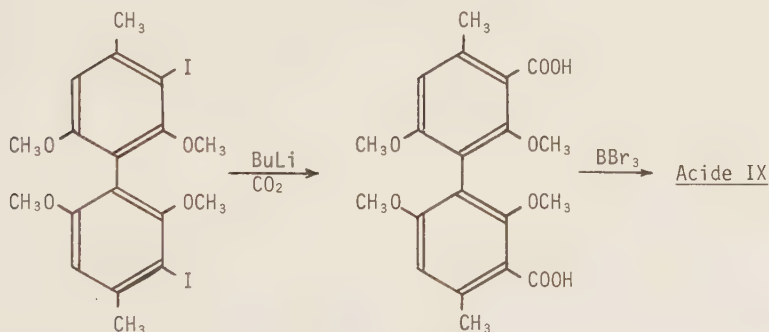
Voie B: (Tétraméthoxybitolyl)





Dinitro-tétraméthoxybitolyl (36)

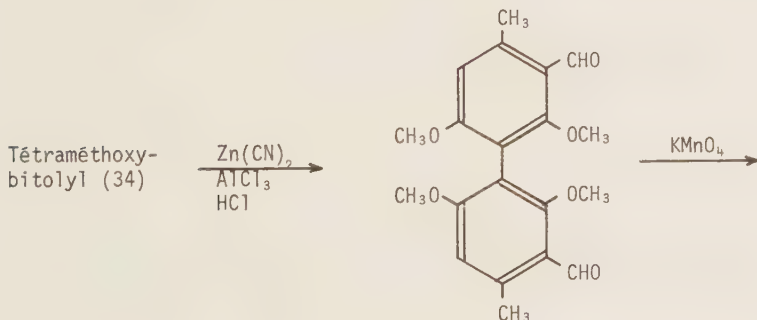
Diamino-tétraméthoxybitolyl (37)



Diiodotétraméthoxybitolyl (38)

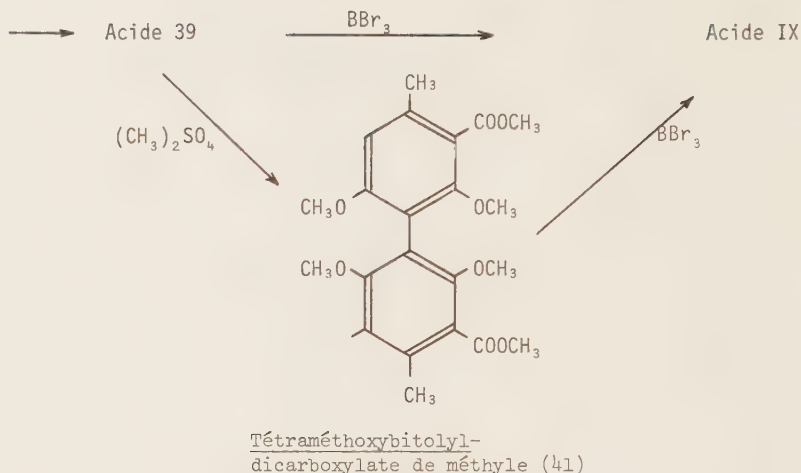
Acide tétraméthoxybitolyl-dicarboxylique (39)

Voie C: (Tétraméthoxybitolyl)



Tétraméthoxybitolyl (34)

Tétraméthoxybitolyl-dialdéhyde (40)



1.3. SCHEMAS DE SYNTHÈSE DES PIGMENTS

1.3.1. Introduction

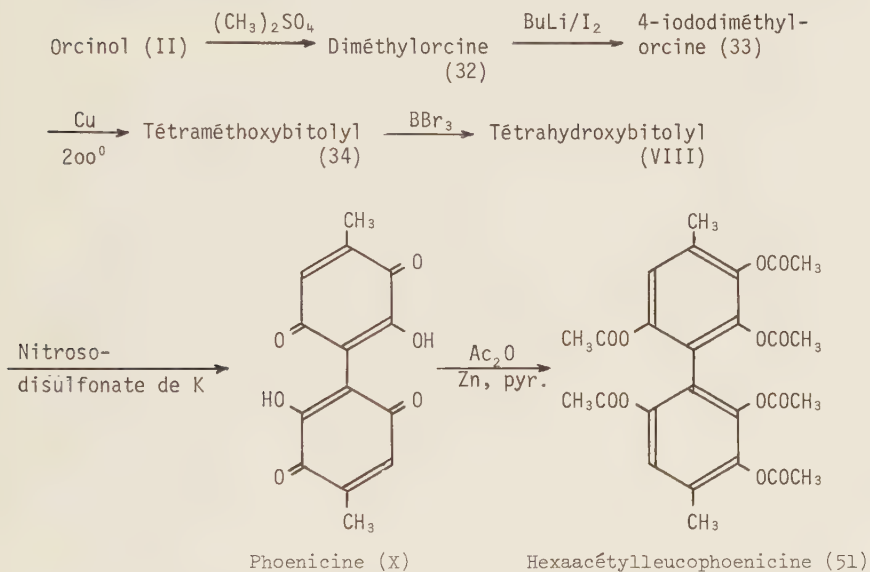
Bien que la synthèse chimique de la phoenicine et de l'oosporéine eût déjà été réalisée /4, 5, 6/, la préparation des précurseurs destinés à l'étude de la biosynthèse nous a amenés à synthétiser ces deux pigments par des voies nouvelles et simplifiées, ainsi que la pyxiférine et la déméthyl-pyxiférine, dont la synthèse chimique n'avait pas encore été réalisée.

1.3.2. Schéma de synthèse de la phoenicine

Pour la synthèse de la phoenicine, l'originalité par rapport au schéma proposé par Musso et col. /6/ réside d'une part dans la préparation de la 4-iododiméthylorcine par l'action du n-butyllithium et de l'iode sur la diméthylorcine, en remplacement de la nitration de l'orcinol qui implique la séparation des isomères ortho et para (rendement en para: 10 à 12 %), et d'autre part dans la déméthylation du

tétraméthoxybitolyl par le tribromure de bore /19/.

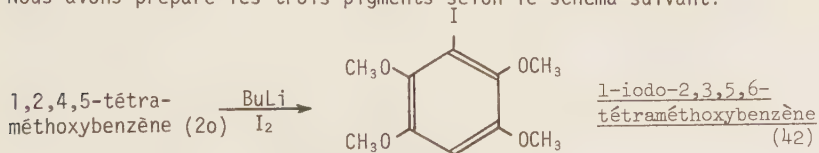
Schéma:

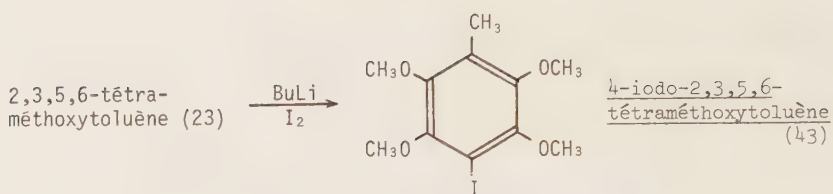


1.3.3. Schéma de synthèse de l'oosporéine, de la pyxiférine et de la 2,5,2',5'-tétrahydroxy-dibenzoquinone

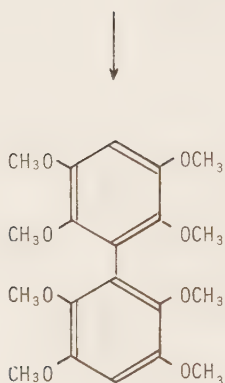
Jusqu'ici, seule l'oosporéine avait été préparée par voie chimique, d'une part à partir de la phoenicine par l'intermédiaire de la quinone-imine /7/, d'autre part par traitement du 2,3,2',3'-bis-méthylènedioxy-5,6,5',6'-tétraméthoxybitolyl-4,4' par KOH dilué et précipitation du pigment par HCl /14/.

Nous avons préparé les trois pigments selon le schéma suivant:

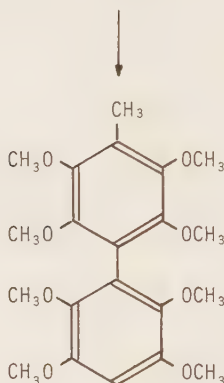




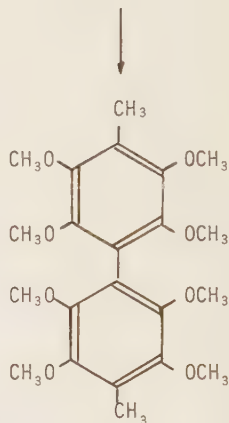
Couplage 42 + 43 (Cu, 200°)



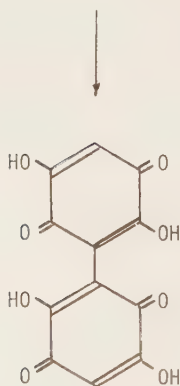
2,3,5,6,2',3',5',6'-octaméthoxybiphényle (44)



2,3,5,6,2',3',5',6'-octaméthoxy-4-méthyl-biphényle (45)

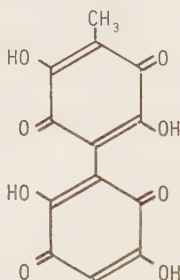


Octaméthylleuco-oosporéine (46)

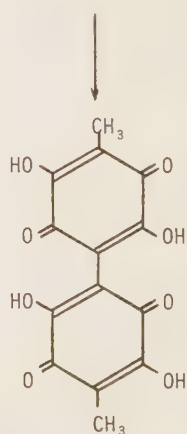


2,5,2',5'-tétrahydroxydibenzoquinone (XI)

Déméthylation (BBr₃) + oxydation (air)

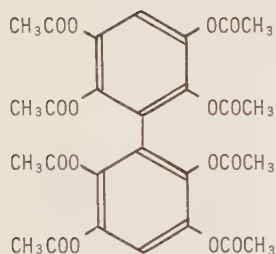


2,5,2',5'-tétrahydroxy-4-méthyl-dibenzoquinone (pyxiférine) (XII)

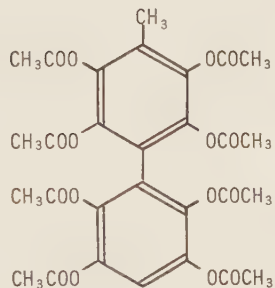


Oosporéine (XIII)

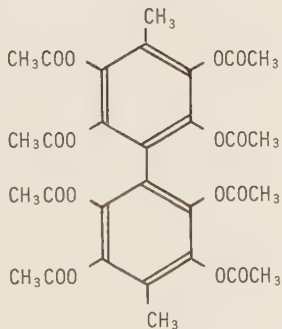
Acétylation réductrice (Ac_2O , Zn , pyr.)



2,3,5,6,2',3',5',6'-octa-
acétoxybiphényl (47)



2,3,5,6,2',3',5',6'-octa-
acétoxy-4-méthyl-biphényl (48)



Octaacétylleucoosporéine
(49)

2. ETUDE DE QUELQUES PROPRIETES DES DERIVES DE L'ORCINOL ET DES PIGMENTS

2.1. CONSTANTES ACIDE-BASE DES PIGMENTS

2.1.1. Phoenicine

Titration du pigment

Nous avons dissous environ 8 mg de phoenicine dans 10 ml d'une solution 0,1 M de KCl dans le mélange dioxane-eau 1/1 et titré par une solution 0,1 N de NaOH, ajoutant des portions de 10 μ l. Les lectures ont été faites au moyen d'un pH-mètre Methrom E 500 digital muni d'une électrode de verre combinée, à la température de 25⁰ avec agitation magnétique et courant d'azote.

Calculs

La courbe de titration présente deux sauts de pH très nets et leur position correspond très bien à la concentration du pigment.

Nous avons utilisé pour le calcul des constantes acide-base les services de l'ordinateur CDC 3800 et le programme MALIK du centre cantonal d'informatique de l'université de Genève. Ce programme calcule à partir du pH expérimental et de la concentration de soude dans la solution, d'une part la meilleure concentration de pigment, et d'autre part le meilleur K_{AB} , par la méthode des moindres carrés:

$$\frac{d(\sum (pH_{th} - pH)^2)}{dK_{AB}} = 0 \quad \text{et} \quad \frac{d(\sum (pH_{th} - pH)^2)}{dC} = 0$$

où: C = concentration du pigment
 pH = pH expérimental
 pH_{th} = pH calculé en fonction d'un certain K_{AB} et
d'une certaine C

Le programme recalcule ensuite le K_{AB} pour chaque point de la courbe à partir de la concentration optimale de pigment et donne le K_{AB} moyen.

Résultats:

	Essai	Conc. optimum	Log K_{AB} opt.	Log K_{AB} moyen
K_1	1	$3,06 \cdot 10^{-3} \pm 0,36$	$4,13 \pm 0,13$	$4,14 \pm 0,13$
	2	$2,89 \cdot 10^{-3} \pm 0,35$	$3,96 \pm 0,13$	$3,99 \pm 0,13$
K_2	1	$3,00 \cdot 10^{-3} \pm 0,35$	$7,86 \pm 0,15$	$7,86 \pm 0,15$
	2	$2,95 \cdot 10^{-3} \pm 0,37$	$7,56 \pm 0,15$	$7,56 \pm 0,15$

Log K_1 moyen: $4,05 \pm 0,13$

Log K_2 moyen: $7,71 \pm 0,15$

Ces résultats sont donc légèrement différents de ceux donnés par Musso et col. /20/ qui avaient déterminé les pK de la phoenicine par titration potentiométrique et par spectroscopie dans différents tampons:

3,95 et 7,30 par titration, 3,85 et 7,18 par spectroscopie.

2.1.2. Oosporéine, "pyxiférine" et tétrahydroxydibenzoquinone

Nous avons effectué plusieurs essais de titration de ces trois pigments dans les conditions décrites pour la phoenicine, mais nous n'avons jamais pu obtenir une courbe caractéristique d'un acide tétrabasique, la courbe présentant un seul saut important et deux vagues à peine décelables et dont la position ne correspond pas à la concentration du pigment. C'est probablement la présence de 4 OH acides de pK voisins qui rend confuses les courbes de titration, si bien que nous que nous n'avons pas pu calculer ces constantes.

2.2. SPECTRES D'ABSORPTION UV-VISIBLE DES PIGMENTS

En ce qui concerne l'absorption UV-visible des pigments, ils présentent aussi bien dans l'eau que dans l'alcool 3 bandes d'absorption principales: une bande 1) dans l'UV lointain, une bande 2) dans l'UV proche et une bande 3) dans le visible, phénomène général pour les p-benzoquinones /21/.

	λ_1	ϵ_1	λ_2	ϵ_2	λ_3	ϵ_3
Phoenicine (eau)	216 nm	17000	270 nm	19200	488 nm	2250
(methanol)	218	14000	266	25000	402	2200
(éthanol)	217	11000	267	21000	408	2200
litt. /22/ (methanol)	--		268	33000	406	2400
/23/ (méthanol)	--		266	24700	404	1600
Oosporéine (méthanol)	224	19400	291	40800	410	$\sim 780^*$
litt. /11/ (méthanol)	--		262	25000	310-340	~ 1000
"Pyxiférine"(méthanol)	224	16000	288	40200	410	$\sim 870^*$
Tétrahydroxy-dibenzo-quinone (méthanol)	224	12600	285	35100	410	$\sim 770^*$

* La bande dans le visible des 3 pigments tétrahydroxylés n'est pas très nette. Il s'agit en fait d'un palier accolé à la bande 2)

En revanche, en ce qui concerne l'extinction moléculaire, contrairement à la p-benzoquinone où la bande 1) est la plus importante, ($\epsilon = \sim 20000$ contre 3-4000 pour la bande 2) /24, 25/), c'est ici la bande 2) qui devient la plus importante ($\epsilon = \sim 40000$). En fait, l'absorption de la bande 1) reste à peu près constante alors que celle des bandes 2) et 3) est très fortement augmentée (la bande 3) passe de 20 à 1000).

Du fait que ces molécules présentent des propriétés d'acides on peut s'attendre à de fortes variations, soit du maximum d'absorption, soit de l'extinction moléculaire, en fonction du pH. Des observations antérieures avaient déjà montré que les solutions de phoenicine changent de couleur avec le pH (jaune à violet) /3, 4/.

Nous avons donc déterminé, pour les 4 pigments, les courbes d'absorption UV-visible en fonction du pH et calculé les extinctions moléculaires pour chaque maximum.

A cet effet, nous avons dissous l'échantillon de pigment (env. 10 mg) dans 10 ml de méthanol et nous avons dilué cette solution 100 fois pour les mesures dans l'UV et 10 fois pour les mesures dans le visible avec des solutions tampons de pH 1 à 12, préparées en mélangeant les volumes nécessaires des solutions suivantes:

pH 1 et 2 : KCl 0,1 M

HCl 0,1 M

pH 3 et 4 : Acide citrique 0,1 M

Na₂HPO₄ 0,1 M

pH 5 à 9 : NaH₂PO₄ 0,1 M

Na₂HPO₄ 0,1 M

pH 10 à 12: Na₂HPO₄ 0,1 M

Na₃PO₄ 0,1 M

Les résultats sont donnés dans les tableaux des pages 22-23.

Chez la phoenicine, la bande 2), qui possède l'extinction moléculaire la plus forte, n'est pratiquement pas modifiée, soit par son λ_{max} , soit par son ϵ , lorsque l'on fait varier le pH. En revanche, les bandes 1) et 3) varient fortement. En ce qui concerne la bande 3), on sait que la coloration change avec le pH. Le virage, caractérisé par un déplacement bathochrome ($\lambda = 410 \text{ nm} \rightarrow 480 \text{ nm}$) a lieu entre les pH 1 et 2.

La bande 1) subit également un changement important à pH 3. A partir de 4, elle se renforce régulièrement jusqu'à 10 en même temps qu'elle subit un léger déplacement bathochrome. En milieu fortement basique, elle diminue d'intensité.

Le pigment est stable aux pH étudiés. Certains spectres (pH 8, 10 et 12) réenregistrés après que l'on a laissé reposer les solutions une nuit se superposent parfaitement à ceux des solutions fraîchement préparées.

MAXIMA D'ABSORPTION UV-VISIBLE DE LA PHOENICINE, DE L'OOSPOREINE, DE LA 2,5,2',5'-
TETRAHYDROXY-4-METHYL-DIBENZOQUINONE (PYXIFERINE) ET DE LA 2,5,2',5'-TETRAHYDROXY-DIBENZOQUINONE

pH	PHOENICINE					OOSPOREINE						
	λ_1	ϵ_1	λ_2	ϵ_2	λ_3	ϵ_3	λ_1	ϵ_1	λ_2	ϵ_2	λ_3	ϵ_3
1	207	14000	270	29600	404	1800	207 (220)	18300 (16800)	290	31500	~455	640
2	208	13200	270	28200	410	1750	209 (225)	22900	292	32800	~485	720
3	225	11000	270	25500	480	1970	--- 227-243	12900	294	32900	503	1190
4	216	20000	269	24500	492	2490	211 (242)	30400 (15100)	294	32200	512	1330
5	217	24400	270	25200	498	2820	213 (243)	32600 (14500)	300	27000	526	1650
6	220	30400	272	22200	516	3400	215 (244)	38600 (17400)	306	29300	530	1620
7	221	31800	273	21100	522	3670	217 (245)	36100 (15200)	321	29300	540	1190
8	221	33200	273	21700	522	3780	218 (243)	38300 (16000)	328	37000	540	810
9	221	33000	273	21400	522	3670	218 (242)	38300 (16800)	328	40300	540	620
10	221	32500	273	21200	522	3750	219 (241)	38300 (17400)	330	42000	540-50	490
11	224	28200	273	20000	522	3700	220 (241)	38300 (17400)	330	42000	540-50	490

12	227	26000	273	21800	522	3670	226 (242)	5200 (1100)	330	42300	542	400
2,5,2',5'-TETRAHYDROXY-4-METHYL-DIBENZOQUINONE							2,5,2',5'-TETRAHYDROXY-DIBENZOQUINONE					
1	207 (222)	14600 (12800)	287	31200	~430	640	207 (225)	14000 (11200)	236	33600	~430	760
2	208 (230)	19500 (9900)	289	29700	~480	820	208	20500	287	31700	482	1020
3	230 242	9600 9900	291	27100	500	1250	225	8400	290	25800	498	1370
4	210 (243)	27100 (11400)	295	26400	506	1520	208 (245)	28300 (10600)	294	25500	502	1700
5	211 244	32650 13100	301	27100	515	1550	210 (245)	30700 (10900)	302 (330)	24800 (14200)	~506	1650
6	212 (245)	33500 (12200)	314 (327)	27000 (22700)	525	1330	211 (246)	31300 (10600)	315 (328)	27700 (24800)	~510	1210
7	215 (246)	35600 (14600)	321	35600	530	1000	214 (248)	30800 (10000)	320	34400	~520	830
8	215 (245)	35000 (13400)	325	38700	534	670	214 (245)	32200 (10900)	324	39200	~530	590
9	215 (243)	36900 (13600)	325	41300	~535	550	214 (245)	32100 (10500)	322	40000	~530	590
10	217 (244)	33800 (13100)	326	41000	~545	470	216 (245)	31600 (11400)	323	41300	~530	530
11	221 (243)	27300 (13700)	326	41100	~540	470	220 (242)	23500 (11500)	323	41300	~530	500
12	225 (244)	20700 (13400)	326	41400	~540	440	225 (245)	16500 (11200)	324	41300	~525	440

En ce qui concerne les 3 pigments tétrahydroxylés, leurs spectres respectifs sont à peu près identiques, à tous les pH. C'est toujours la bande 2) qui est la plus importante, sauf aux pH 5 à 8 où elle passe par un minimum. Sa longueur d'onde augmente régulièrement avec le pH jusqu'à 10, puis se stabilise.

La bande 1) est en réalité une double bande, dont la résolution est possible à certains pH (3 et 4). La bande principale, la plus éloignée dans l'UV présente seulement un épaulement plus ou moins accentué aux autres pH. Cette bande principale, qui est beaucoup plus faible dans les solutions alcooliques, disparaît également au pH 3. Les longueurs d'onde de ces deux bandes augmentent régulièrement avec le pH.

La bande 3) enfin est très étalée et ne présente pas toujours un maximum, se réduisant alors à un palier accolé à la bande 2), si bien que les λ indiqués sont approximatifs. Son absorption moléculaire est toujours plus faible que pour la phoenicine. Elle présente comme pour ce dernier pigment un fort déplacement bathochrome, mais déjà à partir du pH 1. Dès le pH 2, le déplacement est régulier jusqu'au pH 7, puis se stabilise. En revanche, l'absorption moléculaire diminue nettement à partir de pH 8 et les solutions très basiques sont presque incolores, ce qui pourrait s'expliquer par une dégradation de ces quinones dans ces milieux. Nous avons noté une diminution de l'intensité des bandes 1) et 2) par rapport au spectre à pH 6 dans le spectre d'une solution basique (pH 12) ramenée à pH 6 par une goutte de HCl conc. Les résultats indiqués pour les 3 pigments tétrahydroxylés restent donc douteux en ce qui concerne les pH supérieurs à 10.

2.3. SPECTRES DE RESONANCE MAGNETIQUE NUCLEAIRE

2.3.1. Enregistrement des spectres

Nous donnons dans les tableaux des pages 26 à 28 les déplacements chimiques δ de tous les dérivés de l'orcinol et du tétrahydroxybitolyl que nous avons préparés ou que nous avons eus à disposition au cours de ce travail. Nous étudierons cependant plus en détail les dérivés de l'orcinol et de la diméthylorcine qui sont les seuls à être en nombre suffisant pour le permettre.

Nous avons classé ensemble les dérivés de l'orcinol, puis ceux de la diméthylorcine, du tétrahydroxybitolyl, du tétraméthoxybitolyl et enfin les pigments. Les numéros se rapportent aux schémas de synthèse (p. 7 à 17)

Les spectres, destinés avant tout à la caractérisation et au contrôle de l'identité des produits préparés, ont été déterminés à la température de 35°, à une concentration d'environ 50 à 70 % poids-volume, dans différents solvants: CCl_4 , CDCl_3 , $\text{DMSO } d_6$, et CD_3OD , au moyen d'appareils Perkin-Elmer R 12 (60 MHz) et R 32 (90 MHz).

Les substances étudiées n'ayant pas de protons aromatiques viosins, il n'y a pas de couplages possibles entre ces protons, et nous n'avons pas observé de couplages à longue distance.

3.2.2. Aspect théorique

Nous nous sommes basés pour notre étude sur les principes généraux suivants:

1) Un substituant aromatique attracteur d'électrons produit un déplacement paramagnétique des protons aromatiques (déblindage, augmentation du δ dans l'ordre ortho > para > méta. Un substituant électron-

TABLEAUX DES DEPLACEMENTS CHIMIQUES

1. Dérivés de l'orcinol (1-méthyl-3-5-dihydroxybenzène)

N° prod. (schéma)	Substituants			Solvant	Déplacements chimiques				
	2	4	6		CH ₃	H _{ar.}	OH	Autres	
II	-	-	-	DMSO d ₆	2,12	5,99-6,00	8,85		
III	CHO	-	-	DMSO d ₆	2,48	6,23-6,28	10,73-12-18	CHO 10,15	
IV	COOH	-	-	DMSO d ₆	2,44	6,24	-	COOH -	
-	COOEt	-	-	DMSO d ₆	2,33	6,22	10,03-10,97	CH ₂ -CH ₃ 4,32-1,30	
5	COOEt	Br	Br	DMSO d ₆	2,32		10,22		
25	-	COOH	-	DMSO d ₆	2,20	6,20	9,08	COOH -	
-	-	NO ₂	-	CDCl ₃	2,30	6,42	10,64		
VI	OH	-	-	DMSO d ₆	2,06	6,11	7,35-8,44-8,83		
15	OH	-	CHO	DMSO d ₆	2,36	6,20	-	CHO 10,02	
24	OH	-	OH	DMSO d ₆	2,01	6,27	7,40		
V	OH	-	COOH	CD ₃ OD	2,42	6,18	CD ₃ OH	COOH CD ₃ OH	
-	NO ₂	NO ₂	NO ₂	DMSO d ₆	2,28		12,30		

2. Dérivés de la diméthylorcinol (1-méthyl-3-5-diméthoxybenzène)

32	-	-	-	CDCl ₃	2,33	6,44	3,80
33	-	I	-	CCl ₄	2,13	6,35	3,36
			-	CDCl ₃	2,33	6,31	3,83
			-	CCl ₄	2,31	6,21	3,82

20	-	CONH ₂	-	2,33	6,37	3,79	CONH ₂	-
-	Br	COOH	-	2,39	6,92	3,79	COOH	-
-	Br	COOCH ₃	-	2,40	6,60	3,85-3,90	COOCH ₃	3,79
-	-	NO ₂	-	2,35	6,41	3,82		
13	OCH ₃	-	-	2,23	6,26-6,30	3,72-3,81	CHO	10,45
-	CHO	-	-	2,58	6,30	3,84-3,86	COOH	-
-	COOH	-	-	2,21	6,41	2,74-2,76	CH ₂ -CH ₃	4,38-1,36
-	COOEt	-	-	2,30	6,35	3,80	CHO	10,45
17	OCH ₃	-	CHO	2,54	6,39	3,71-3,90-3,94	COOH	-
18	OCH ₃	-	COOH	2,21	6,70	3,64-3,85	CHO	10,45
23	OCH ₃	-	OCH ₃	2,18	6,40	3,71-3,81	COOH	-
43	OCH ₃	I	OCH ₃	2,13		3,80		
20	Tétraméthoxybenzène				6,56	3,82		
42	Iodotétraméthoxybenzène				6,62	3,76-3,85		
21	Chlorométhyl-tétraméthoxybenzène				6,49	3,40-3,82	CH ₂ Cl	4,65

3. Dérivés du tétrahydroxybitolyl (2-6-2'-6'-tétrahydroxy-4-4'-diméthyl-biphényl)

VIII	3-3'	5-5'	DMSO d ₆	2,12	6,12	OH	
IX	-	-	CD ₃ OD	2,59	6,45	8,23	CD ₃ OH
	COOH	-					

4. Dérivés du tétraméthoxybitolyl

N° prod. (schéma)	Substituants		Solvant	Déplacements chimiques			
	3-3'	5-5'		CH ₃	H _{ar.}	OCH ₃	Autres
34	-	-	CDCl ₃	2,35	6,30	3,59	
38	I	-	CDCl ₃	2,53	6,76	3,47-3,72	
40	CHO	-	CDCl ₃	2,81	6,78	3,65-3,93	CHO 10,75
39	COOH	-	DMSO d ₆	2,34	6,80	3,41-3,70	COOH -
41	COOCH ₃	-	CDCl ₃	2,41	6,69	3,76-3,90	COOCH ₃ 3,50

5. Pigments et dérivés

XIII	Oosporéine		DMSO d ₆	1,84		OH	
XII	Pyxiférine		DMSO d ₆	1,83	5,90	8,00	
XI	Déméthylpyxiférine		DMSO d ₆		5,91	8,30	
X	Phénocine		DMSO d ₆	1,98-2,00	6,53-6,60	9,60	
VII	Dihydroxytoluquinone		DMSO d ₆	1,83	5,93	-	
	Octaméthylleuco-					OCH ₃	
46	-oosporéine		CDCl ₃	2,20		3,59-3,78	
45	-pyxiférine		CDCl ₃	2,20	6,57	3,58-3,78-3,82	
44	-déméthylpyxiférine		CDCl ₃		6,63	3,65-3,87	
	Octaacétylleuco-					OCOCH ₃	
49	-oosporéine		CDCl ₃	2,09		2,06-2,31	
48	-pyxiférine		CDCl ₃	2,02	7,38	2,10-2,25-2,30	
47	-déméthylpyxiférine		CDCl ₃		7,39	2,09-2,28	
51	HexaAcLeucophénocine		DMSO d ₆		7,13	CH ₃ + OCOCH ₃ : 1,92-1,97-2,18-2,30	
50	Tétraacétoxytoluène		DMSO d ₆	2,02	7,33	2,33-2,39	

donneur produit au contraire un déplacement diamagnétique (blindage, diminution du δ), toujours dans l'ordre $o > p > m$.

2) Un substituant électron-donneur produisant une charge négative sur un C aromatique lié à un groupe $-CH_3$ ou $-OCH_3$ produit un déplacement paramagnétique des protons du méthyle. Un substituant attracteur d'électrons produit un effet inverse.

Les résultats que nous avons obtenus sont en général conformes aux deux règles exposées ci-dessus, sauf dans le cas des dérivés acétoxylés, où l'effet sur le groupe méthyle est inverse de celui attendu. En fait, le cas du groupement $-OCOCH_3$ est particulier. Il est attracteur d'électrons, mais l'oxygène fixé à un C aromatique peut aussi, par suite d'un effet M, fournir des électrons au noyau. On se trouve ici dans un cas limite.

Un moyen de se donner une image semi-quantitative de ces propriétés électroniques est d'utiliser les constantes σ de Hammett, qui, bien que discutées, offrent cette représentation des propriétés électro-attractrice ou électro-donneuse d'une fonction étudiée. Une constante σ de Hammett est positive pour les groupements électro-attracteurs (elle implique une augmentation des δ) et négative pour les groupements électro-donneurs (diminution du δ)

Nous avons donc tenté de comparer les déplacements chimiques des protons du C-méthyl et des protons aromatiques aux constantes σ de Hammett données dans la littérature /26,27,28,29,30/.

Il a été établi par de très nombreux auteurs /26/ qu'une signification théorique des déplacements chimiques en relation avec les propriétés et l'emplacement des substituants du noyau benzénique ne peut exister que si l'on élimine les interactions intermoléculaires en mesurant les déplacements chimiques à différentes concentrations et en extrapolant à des dilutions infinies, dans des solvants inertes, non polaires.

Mais on a montré /30, 31/ que, du fait de la très forte interaction qui existe entre le DMSO et le groupe OH des phénols, la dépendance des déplacements chimiques par rapport à la concentration est

très atténuée, et du fait que, vu les interactions avec le solvant, l'influence des groupes OH est dirigée vers l'extérieur de la molécule, leurs effets stériques sur les substituants en position ortho sont également très atténués et on trouve alors une bonne correspondance entre les déplacements chimiques des protons ortho et para. On pouvait donc s'attendre à une meilleure corrélation entre les déplacements chimiques et les constantes σ de Hammett chez les dérivés de l'orcinol, dont les spectres ont été déterminés avec des solutions dans le DMSO, que chez les dérivés de la diméthylorcine.

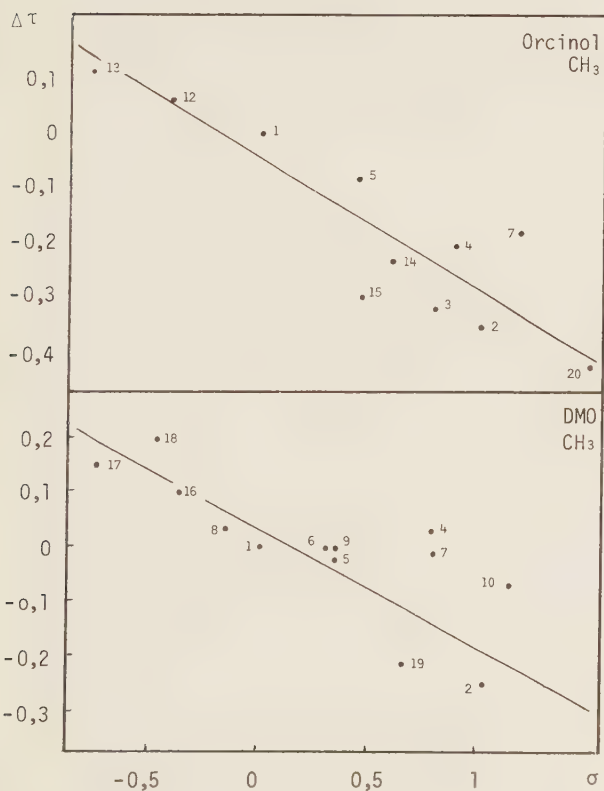
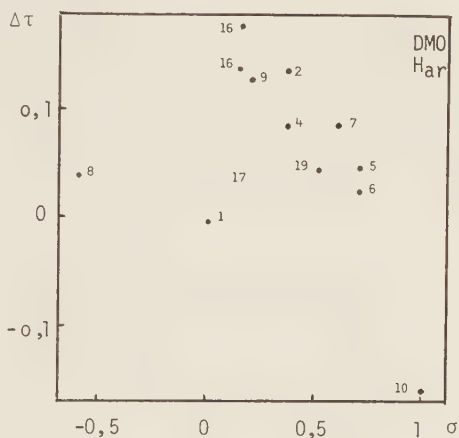
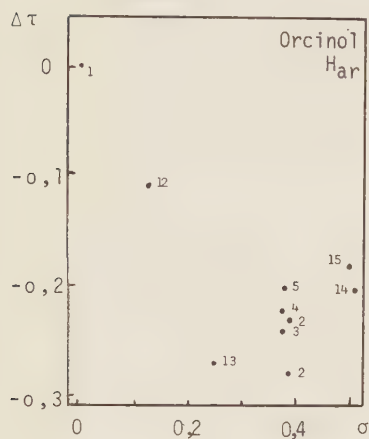
Pour les dérivés de l'orcinol, les graphiques de la page 31 montrent en effet une tendance nette à des déplacements chimiques vers des champs magnétiques plus bas lorsque la somme des constantes σ des substituants des protons aromatiques est positive. Cependant, la valeur de ces déplacements chimiques est loin d'être proportionnelle à celle des constantes σ pour les protons aromatiques.

En ce qui concerne les dérivés de la diméthylorcine, nous ne nous attendions pas, pour les raisons exposées plus haut, à trouver une bonne corrélation entre les déplacements chimiques et les constantes σ . En fait, les graphiques montrent que nous obtenons les mêmes résultats que pour les dérivés de l'orcinol: aucune corrélation de proportionnalité entre les déplacements chimiques et les constantes σ pour les protons aromatiques, corrélation relativement bonne pour les protons du CH_3 .

Tant dans le cas des dérivés de l'orcinol que de ceux de la diméthylorcine, les points qui s'éloignent le plus de la droite sont ceux des dérivés nitrés et des esters carboxyliques.

Nous avons pris comme références pour les graphiques de la page 31 respectivement l'orcinol et la diméthylorcine, à qui nous avons donné les valeurs $\Delta\tau = 0$ et $\sigma = 0$

DEPLACEMENTS CHIMIQUES DES PROTONS AROMATIQUES ET METHYLIQUES DES DERIVES
DE L'ORCINOL ET DE LA DIMETHYLCORCINE EN RELATION AVEC LES CONSTANTES
 σ DE HAMMETT



SUBSTITUANTS

	2	4	6
1	-	-	-
2	CHO	-	-
3	COOH	-	-
4	COOEt	-	-
5	-	COOH	-
6	-	COOMe	-
7	-	NO ₂	-
8	-	NH ₂	-
9	-	I	-
10	Br	COOMe	-
11	COOEt	Br	Br
12	OH	-	-
13	OH	-	OH
14	OH	-	CHO
15	OH	-	COOH
16	OCH ₃	-	-
17	OCH ₃	-	OCH ₃
18	OCH ₃	I	OCH ₃
19	OCH ₃	-	CHO
20	COOH	Br	Br

Nous pensons que cette mauvaise corrélation est due aux conditions dans lesquelles ces spectres ont été enregistrés: fortes concentrations, noyaux benzéniques très fortement substitués, d'où une augmentation des interactions intermoléculaires et des effets stériques des substituants. On sait en effet que la relation entre δ et σ n'est à peu près linéaire que pour les protons ortho et para des dérivés monosubstitués.

Le fait que cette corrélation soit relativement bonne seulement pour les protons des méthyle doit être attribué à la position des groupements hydroxy et méthoxy, qui sont toujours en ortho des protons aromatiques. Dans ces conditions, les effets électronique et surtout stérique des hydroxy et des méthoxy peuvent masquer l'influence des autres substituants. Le groupe méthyle n'a quant à lui pas à subir ces influences, puisqu'il est situé d'une part plus à l'extérieur du noyau, et que, d'autre part, il n'est directement entouré que par des protons aromatiques ou par les substituants à étudier. Ils peuvent donc subir beaucoup plus directement l'influence électronique de ces substituants.

2.4. CHROMATOGRAPHIE

Nous donnons ci-dessous la liste des Rf des produits que nous avons préparés.

Les chromatographies ont été effectuées avec le système 1 (cf. partie expérimentale), sur des couches minces de Silice Merck HF 254.

Produit et No (cf. schémas)	Rf
Orcinol (II)	0,17
Aldéhyde orsellinique (III)	0,34
Acide orsellinique (IV)	0,24
Orsellinate d'éthyle	0,44
Dibromoorsellinate d'éthyle (5)	0,73
Acide p-orsellinique (25)	0,07
4-nitroorscinol	0,13
4-iodoorscinol	0,29

2-bromoorcinoï	0,29
Sel de K du 2-nitrosoorcinoï (7)	0,18
2,3,5-trihydroxytoluène (15)	0,02
3,4,6-trihydroxy-o-tolualdéhyde (15)	0,16
Acide hydroxyorsellinique (V)	0,04
2,3,5,6-tétrahydroxytoluène (24)	0,25
Diméthylorcine (32)	0,85
4-iododiméthylorcine (33)	0,90
2-bromodiméthylorcine	0,92
4-aminodiméthylorcine (29)	0,44
Acide diméthyl-p-orsellinique (27)	0,27
Diméthyl-p-orsellinate de méthyle (26)	0,56
Diméthyl-p-orsellinamide (28)	0,06
Acide bromo-diméthyl-p-orsellinique	0,28
Bromo-diméthyl-p-orsellinate de méthyle	0,72
2,3,5-triméthoxytoluène (13)	0,69
2,3,6-triméthoxytoluène (14)	0,74
Aldéhyde diméthylorsellinique	0,56
Acide diméthylorsellinique	0,27
3,4,6-triméthoxytolualdéhyde (17)	0,34
Acide 3,4,6-triméthoxytoluïque (18)	0,27
2,3,5,6-tétraméthoxytoluène (23)	0,52
2,3,5,6-tétraacétoxytoluène	0,23
1,2,4,5-tétraméthoxybenzène (20)	0,34
3-iodo-1,2,4,5-tétraméthoxybenzène (42)	0,56
4-iodo-2,3,5,6-tétraméthoxytoluène (43)	0,79
1-chlorométhyl-2,3,5,6-tétraméthoxybenzène (21)	0,55
Tétrahydroxybitolyl (VIII)	0,09
Acide tétrahydroxybitolyl-dicarboxylique (IX)	0,04
Tétraméthoxybitolyl (34)	0,65
Diiodotétraméthoxybitolyl (38)	0,88
Tétraméthoxybitolyl-dialdéhyde (40)	0,33
Acide tétraméthoxybitolyl-dicarboxylique (39)	0,23
Tétraméthoxybitolyl-dicarboxylate de méthyle (41)	0,32
Octaméthylleuco-déméthylpyxiférine (44)	0,28
-pyxiférine (45)	0,41
-oosporéine (46)	0,58
Octaacétylleuco-déméthylpyxiférine (47)	0,03
pyxiférine	0,11
-oosporéine	0,12
Hexaméthylleucophoenicine	0,54
Hexaacétylleucophoenicine	0,24

3.

PARTIE EXPERIMENTALE

3.1. INTRODUCTION

Dans les pages qui suivent, nous décrirons la préparation de tous les produits, qui figurent dans les schémas des pages 5 et suiv. et nous citerons simplement les réactions qui n'ont pas réussi.

Sauf indications contraires, les produits connus, préparés par des méthodes décrites dans la littérature sans modifications, ont été obtenus avec les rendement et la pureté indiqués. Nous décrirons plus en détail la préparation des produits connus par des voies originales et la préparation des produits nouveaux.

Tous les produits préparés ont été caractérisés par leur spectre de RMN, dont les résultats sont rassemblés dans les tableaux des pages 27 à 29, par leur point de fusion (non corrigés) et par la chromatographie sur plaques, parfois par leur spectre IR et UV-visible, et pour les produits nouveaux, par l'analyse élémentaire et par leur spectre de masse.

Les spectres de RMN ont été enregistrés au moyen des appareils Perkin-Elmer R 12 et R 32 (cf. p. 26), les spectres UV-visible au moyen d'un spectrophotomètre Perkin-Elmer 402, les spectres IR au moyen d'un spectrophotomètre Perkin-Elmer 257 et les spectres de masse au moyen d'un spectromètre à haute résolution Varian Mat-SM1-BH.

Les chromatographies analytiques ont été effectuées sur des couches minces (0,25 mm) de Silice Merck HF 254, avec les systèmes de solvants suivants:

Syst. 1: Benzène-Acétate d'éthyle-Acide acétique 100/10/2

Syst. 2: n-Propanol-n-Butanol-NH₃ 2N 6/1/3

Les chromatographies préparatives ont été faites sur des couches épaisses (1,5 mm) de Silice Merck PF 254, avec le système 1.

3.2. ACETOACETATE DE LITHIUM (I)

Ce produit a été préparé par saponification de l'acétoacétate d'éthyle au moyen de LiOH selon la méthode décrite par L.M. Hall /32/ et purifié dans le mélange méthanol éther.

A partir de 500 mg d'ester, nous avons obtenu 260 mg de sel de lithium (rendement: 63 %).

3.3. ALDEHYDE ORSELLINIQUE (III)

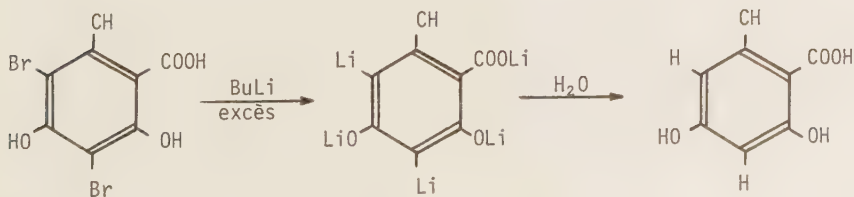
L'aldéhyde orsellinique a été préparé par réaction de l'orcinol avec $Zn(CN)_2$ et $AlCl_3$ anhydre dans l'éther sec sous courant de HCl (réaction de Gattermann-Adams) /33/. A partir de 4 g. d'orcinol, on obtient 4,2 g. d'aldéhyde (rendement: 85 %) de PF 179-181 (litt. 181-182)

3.4. ACIDE ORSELLINIQUE (IV)

Nous avons préparé l'acide orsellinique par condensation des esters crotonique et acétoacétique, bromation du dihydroorsellinate d'éthyle, saponification de l'ester dibromoorsellinique et enfin réduction de l'acide dibromoorsellinique pour obtenir l'acide orsellinique avec les rendements indiqués dans la littérature /34, 35/.

Cependant, en vue de la préparation d'acide orsellinique tritié sur le noyau, nous avons mis au point une nouvelle méthode de réduction de l'acide dibromoorsellinique, par traitement au butyllithium et hydrolyse du dérivé lithié par l'eau.

Schéma de la réduction de l'acide dibromoorsellinique



Méthode:

50 mg d'acide dibromorsellinique (6) dissous dans 1 ml d'éther anhydre ont été traités par 14 équivalents de n-butyllithium (2,4 ml à 0,95 mMol/ml) et agités pendant $\frac{1}{2}$ d'heure à température ambiante. Le dérivé lithié a été ensuite hydrolysé par un excès d'eau et l'acide régénéré par neutralisation au moyen de HCl 6N. Le produit a été extrait à l'éther, puis par une solution de bicarbonate 1N et reprécipité par l'acide chlorhydrique, filtré, redissous dans 1 ml de méthanol et purifié par chromatographie sur plaques. La bande correspondant à l'acide orsellinique a été éluée par le mélange méthanol-chloroforme 1/1. L'évaporation de cette solution a laissé un résidu incolore de cristaux d'acide orsellinique. Il a été repris par un peu de bicarbonate, reprécipité par l'acide chlorhydrique, filtré et séché. Le produit s'est révélé identique à l'acide préparé par hydrogénation catalytique de l'acide dibromorsellinique (PF: 184, chromatographie, spectre de RMN). Rendement: 66 %

3.5. ORCINOL (II)

3.5.1. Voie A

L'orcinol a été préparé par décarboxylation de l'acide orsellinique sous l'action de l'acide chlorhydrique dilué et purifié par sublimation selon la méthode décrite /36/.

A partir de 100 mg d'acide orsellinique, nous avons obtenu 62 mg d'orcinol pur (PF: 107, litt.: 108) Rendement: 84 %

3.5.2. Voie B

3.5.2.1. Diméthylorcine (32)

1 g. de 3,5-diméthoxybromobenzène, préparé à partir de 3,5-diméthoxyaniline par diazotation et traitement du sel de diazonium par une solution de CuBr dans HBr /37/, a été traité 1/4 d'heure à 0° par 10 mMol de n-butyllithium, puis additionné de 0,6 ml de CH₃I et

laissé pendant 1 heure à température ambiante. Après hydrolyse à l'eau, la solution a été extraite à l'éther. L'évaporation de la solution étherée a laissé une huile jaune qui a été distillée à la pression de 19 mmHg et recueillie à 110-111°.

Nous avons obtenu à partir de 1,2 g. de diméthoxybromobenzène 540 mg de diméthylorcine distillée. Rendement: 64 %

Indice de réfraction: $n = 1,5228$

Ref.: $n = 1,5234$ (à 20°)

3.5.2.2. Orcinol (II)

Nous avons déméthylé la diméthylorcine préparée par la méthode décrite ci-dessus, au moyen du tribromure de bore /19/.

500 mg de diméthylorcine dissous dans 2 ml de CH_2Cl_2 ont été traités par 1 ml de BBr_3 à l'abri de l'humidité et laissés à réagir 24 heures à température ambiante. Le mélange a été repris par le méthanol (réaction très violente: on introduit la solution goutte à goutte, très lentement dans 10 ml de méthanol agité par un barreau magnétique), la solution méthanolique évaporée à sec et le résidu repris 3 fois par quelques ml de méthanol. Le résidu a finalement été repris par un peu de Na_2CO_3 1N, reprecipité par l'acide chlorhydrique filtré et purifié par sublimation.

A partir de 500 mg de diméthylorcine, nous avons obtenu 260 mg d'orcinol sublimé. PF: 105° (litt.: 108) Chromatographie et spectre de RMN identiques à ceux du produit commercial. Rendement: 63 %

3.6. 2,3,5-TRIHIDROXYTOLUENE (VI)

3.6.1. Voie A

Nous avons préparé le trihydroxytoluène par oxydation de l'orcinol au moyen du nitrite d'isoamyle, selon la méthode décrite par Henrich /38/ et Asahina /39/. Le rendement du deuxième stade (hydrolyse et réduction du sel de K de la nitrosoorcine par le dithionite) étant très mauvais, et du fait que cette voie impliquait l'introduction du marquage au début, nous avons très vite abandonné cette voie au pro-

de la voie B.

3.6.2. Voie B

3.6.2.1. Préparation du produit de départ

Nous avons préparé le 2,3,5-triméthoxy-bromobenzène (11) à partir de la vanilline par l'intermédiaire de la 5-bromovanilline et de la 2-méthoxy-6-bromohydroquinone, selon la méthode décrite par Dorn et col. /40/ à la différence près que nous avons méthylé l'hydroquinone par le diazométhane. Nous avons purifié le produit par distillation sous une pression de 0,1 mmHg à 98-100°. PF: 31°(litt.: 37)

3.6.2.2. 2,3,5-triméthoxytoluène (13)

Nous avons fait réagir des quantités équivalentes de 2,3,5-triméthoxy-bromobenzène et de n-butyllithium et traité immédiatement par un excès de CH_3I , ajouté par petites portions et avec une bonne agitation (la réaction est très violente). Après une heure, nous avons repris par de l'eau et extrait le produit à l'éther. L'évaporation de la solution étherée a laissé un résidu huileux composé principalement de deux produits que nous avons séparés et purifiés par chromatographie sur plaques de SiO_2 avec le système 1.

Détermination de ces deux produits

Chromatographie: Produit 1: $R_f = 0,69$

Produit 2: $R_f = 0,74$

La chromatographie en présence du 2,3,5-triméthoxytoluène préparé par méthylation au diazométhane du 2,3,5-trihydroxytoluène montre que c'est le produit 1 qui est le produit attendu. Il s'agit d'une huile jaune pâle qui ne cristallise pas à + 4°. Le produit a été caractérisé par son spectre de RMN, et la réaction suivante constitue une preuve de sa constitution.

Le spectre de RMN du produit 2 montre également qu'il s'agit de triméthoxytoluène. La substance est une huile jaune pâle, qui cristallise à + 4°. Son PF de 28° nous a amené à penser qu'il s'agissait de 2,3,6-triméthoxytoluène (litt. /41/: PF = 30-31). Un mécanisme de réaction est proposé à la page 10.

A partir de 3 g. de 1-bromo-2,3,5-triméthoxybenzène, nous avons obtenu environ 1 g. de 1 et 500 mg de 2.

Nous avons essayé d'améliorer le rendement en 1 en faisant varier les temps de réaction et la température, mais nous n'avons pas pu améliorer le rapport de 1 à 2.

3.6.2.3. 2,3,5-trihydroxytoluène (VI)

Nous avons adopté pour la déméthylation la méthode au tribromure de bore /19/. 100 mg de 2,3,5-triméthoxytoluène (13) ont été dissous dans 2 ml de CH_2Cl_2 et traités à l'abri de l'humidité par 6 équivalents de BBr_3 à 20 % dans le CH_2Cl_2 pendant 24 heures à température ambiante. La solution a été ensuite mélangée goutte à goutte à 20 ml de méthanol sec (réaction très violente). Après évaporation du méthanol, le résidu a été repris deux fois par 20 ml de méthanol, puis par de l'eau. La solution aqueuse a été décolorée par l'addition de la quantité nécessaire de dithionite, puis extraite rapidement à l'éther. Après évaporation de l'éther, le résidu a été broyé et lavé avec un peu de CS_2 pour éliminer le soufre et sublimé, puis broyé à nouveau, lavé avec du CS_2 et resublimé. Nous avons obtenu ainsi 35 mg de produit pur et presque incolore, identique au produit préparé par la méthode A. PF: 148-151 (litt.: /39/ 148)
Rendement: 45 %

3.7. ACIDE HYDROXYORSELLINIQUE (V)

3.7.1. Voie A

Cette méthode consistait à préparer à partir du 2,3,5-trihydroxytoluène (VI) le 3,4,6-trihydroxy-o-tolualdéhyde (aldéhyde hydroxy-

orsellinique)(15) par la réaction de Gattermann-Adams, à traiter ce produit par le chloroformiate de méthyle et NaOH, à oxyder le tri-O-carbométhoxyhydroxyorsellinaldéhyde (16) obtenu en l'acide correspondant par KMnO_4 dans l'acétone et à libérer l'acide hydroxyorsellinique par l'action de NaOH alcoolique sous atmosphère de H_2 /42/.

Malgré plusieurs essais effectués dans différentes conditions, nous n'avons jamais réussi à préparer l'aldéhyde tri-O-carbométhoxyhydroxyorsellinique. La chromatographie du mélange réactionnel nous a montré que nous obtenions plusieurs produits partiellement bloqués, dont nous avons isolé les deux plus importants et déterminé au moyen de leur spectre de RMN qu'il s'agissait d'un dérivé dicarbométhoxylé et d'un dérivé monocarbométhoxylé. Le dérivé dicarbométhoxylé, le plus abondant, a été oxydé en acide correspondant et hydrolysé par NaOH alcoolique sous courant de H_2 . Mais même dans ces conditions, le produit s'oxyde très rapidement en solution fortement basique, et la solution devient presque noire. Nous n'avons pas pu isoler le produit final par cette méthode.

3.7.2. Voie B

A partir du 2,3,5-triméthoxytoluène (13), nous avons préparé par la méthode de Gattermann-Adams l'aldéhyde 3,4,6-triméthoxy-o-toluique (17), que nous avons oxydé en l'acide correspondant (18) et déméthylé par le tribromure de bore.

3.7.2.1. 3,4,6-triméthoxytolualdéhyde

Nous avons dissous 1 g. de 2,3,5-triméthoxytoluène (13) dans 500 ml d'éther sec et ajouté 2,8 g. de $\text{Zn}(\text{CN})_2$ et 3,2 g. de AlCl_3 anhydre. On fait passer ensuite un fort courant de HCl séché par passage dans 2 flacons de H_2SO_4 conc. et on agite bien. Au début, tout passe en solution, puis une huile verte ou brune se sépare. Après deux heures, on remet les mêmes quantités de $\text{Zn}(\text{CN})_2$ et de AlCl_3 et on laisse 24 heures sous courant de HCl. L'éther est ensuite évaporé, on reprend par 10 ml d'eau, on porte à ébullition quelques minutes, on refroidit

à la glace et on filtre le précipité brun qu'on lave à l'eau glacée. Le produit est dissous dans un peu de chloroforme, la solution filtrée pour éliminer les produits colorés insolubles, évaporée et le résidu recristallisé dans le minimum d'alcool bouillant.

A partir de 1 g. de 2,3,5-triméthoxytoluène, nous avons obtenu 950 mg d'aldéhyde de PF 103⁰(litt. /43/: 104)
Rendement: 83 %

3.7.2.2. Acide 3,4,6-triméthoxytoluique (18)

On dissout 200 mg d'aldéhyde dans 100 ml d'acétone et on traite par une solution de 350 mg de KMnO_4 dans 5 ml d'eau. On laisse 4 heures à 40°, puis on ajoute la même solution de KMnO_4 et on laisse de nouveau réagir 4 heures. On fait ensuite passer un courant de SO_2 pour réduire tout le Mn en Mn^{++} , puis on évapore l'acétone. Lorsqu'il ne reste plus que de l'eau, l'acide précipite. Il est alors filtré, redissous dans un peu de NaHCO_3 1N, cette solution est filtrée pour éliminer les produits insolubles et l'acide reprécipité par HCl.

Nous avons obtenu ainsi 95 mg d'acide 3,4,6-triméthoxytoluique brut, de PF 140-2⁰(litt. /43/: 147) Rendement: 65 %

3.7.2.3. Acide hydroxyorsellinique (V)

La déméthylation du produit précédent a été effectuée dans les mêmes conditions que celle du triméthoxytoluène (p. 39), avec les modifications suivantes:

Après l'hydrolyse par le méthanol, nous avons ajouté une goutte de HCl conc. pour protéger de l'oxydation. La solution aqueuse finale décolorée par un peu de dithionite, a été extraite par trois portions d'éther, et le produit purifié par chromatographie sur plaques de SiO_2 (syst. 1) et élué au méthanol. La solution méthanolique a été évaporée, le résidu repris par un peu d'eau additionnée de quelques grains de dithionite et le produit extrait à l'éther. L'évaporation de cette solution a laissé un résidu brun-clair d'acide hydroxyorsellinique que nous n'avons pas réussi à mieux purifier.

Caractérisation du produit:

PF: 132° (litt. /42/: 194°)

Les autres caractéristiques étant bonnes, en particulier l'analyse élémentaire, il pourrait s'agir d'un exemple de dimorphisme

Spectre de RMN: (solvant: CD₃OD)

-CH ₃	= 2,48	Intensité: 3
-H	= 6,18	1
-OH	CD ₃ OH (déplacé)	

Spectre de masse (70 eV)

Masse moléculaire: 184

Pics caractéristiques:

m/e	184 (M ⁺)	166	140	139	94	44
%	7,7	19,1	100	16,4	12,8	33,9

Analyse élémentaire:

Calculé: C = 52,10 % H = 4,35 %

Trouvé: C = 52,16 % H = 4,58 %

3.8. 2,3,5,6-TETRAHYDROXYTOLUENE (24)

3.8.1. 1,2,4,5-tétraméthoxybenzène (20)

A partir de la benzoquinone, nous avons préparé d'après les méthodes décrites /44/ successivement la 2,5-diméthoxybenzoquinone (19) par réaction avec le méthanol et ZnCl₂ anhydre, la 2,5-diméthoxyhydroquinone par réduction au moyen du dithionite de sodium, et enfin le 1,2,4,5-tétraméthoxybenzène par méthylation au sulfate de méthyle en présence de dithionite.

3.8.2 2,3,5,6-tétraméthoxytoluène (23)

3.8.2.1. Voie A

On prépare à partir du tétraméthoxybenzène le 1-chlorométhyl-

2,3,5,6-tétraméthoxybenzène par réaction avec le chlorométhyléther puis le tétraméthoxytoluène par hydrogénation catalytique.

1-chlorométhyl-2,3,5,6-tétraméthoxybenzène:

300 mg de 1,2,4,5-tétraméthoxybenzène, 0,25 ml de mono-chlorométhyléther et 0,8 ml d'acide acétique sont chauffés 3 heures à 110° dans une ampoule scellée. Le produit de réaction est ensuite versé dans 12 ml d'eau et laissé une nuit à cristalliser. Le produit est filtré, séché, repris par du chloroforme et purifié par chromatographie sur une colonne de SiO₂ (syst. 1), puis sublimé à 110° à la pression de 0,1 mmHg.

Nous avons obtenu ainsi 51 mg de produit de PF 90°.

(Rendement: 13,9 %)

2,3,5,6-tétraméthoxytoluène:

La réduction du produit précédent a été tentée par plusieurs moyens: LiAlH₄, LiAlH₄-LiH, hydrogénation catalytique avec comme catalyseur PtO₂, PdCl₂, Pd à 10 % sur charbon actif. C'est cette dernière méthode qui a seule donné un résultat. Le produit ne s'est pas réduit par les autres voies.

250 mg de 1-chlorométhyl-2,3,5,6-tétraméthoxybenzène dissous dans 10 ml d'alcool absolu sont agités avec 31 mg de catalyseur au Pd/C sous atmosphère de H₂ à pression normale. La consommation de H₂ débute presque immédiatement et se termine après 30 minutes. On obtient après filtration du catalyseur et évaporation du solvant 45 mg de produit brut ne contenant plus de produit de départ. Rendement: 85 %

Après recristallisation dans le méthanol, on obtient des cristaux incolores de PF 91-92°.

Le produit a été caractérisé par son spectre de RMN (tableau) et l'analyse élémentaire.

Analyse élémentaire:

Calculé: C = 62,25 H = 7,60

Trouvé: C = 62,30 H = 7,74

3.8.2.2. Voie B

En vue de faciliter l'introduction du marquage isotopique nous avons également préparé le 2,3,5,6-tétraméthoxytoluène par la lithiation du 1,2,4,5-tétraméthoxybenzène avec le butyllithium et traitement du dérivé lithié par CH_3I .

250 mg de 1,2,4,5-tétraméthoxybenzène (20) sont dissous dans 10 ml de tétrahydrofurane et traité à -10° par 2 mMol de n-butyllithium en solution dans l'éther. Le mélange est agité 1/4 d'heure et la température remonte à 25° tandis qu'il se forme un précipité blanc. Le CH_3I est ajouté lentement et le précipité se dissout, puis on verse le mélange dans 50 ml d'eau et le produit est extrait à l'éther et purifié par chromatographie.

Nous avons obtenu après recristallisation dans le méthanol 200 mg de produit pur (rendement: 75 %) identique au produit décrit ci-dessus (voie A): PF: 92° , Rf, spectres IR et de RMN identiques.

3.8.3. 2,3,5,6-tétrahydroxytoluène (24)

3.8.3.1. 3,6-dihydroxytoluquinone (VII)

Nous avons déméthylé le tétraméthoxytoluène en traitant 200 mg de ce produit pendant 48 heures par 1 ml de BBr_3 dans 3 ml de CH_2Cl_2 . Nous avons ensuite traité de la manière habituelle par le méthanol et l'eau. La solution aqueuse a été neutralisée par une solution de NaOH 1N et ajustée à pH 8 par quelques ml de tampon phosphate. On a fait barbotter un courant d'air dans la solution pendant quelques minutes, ce qui l'a fait rapidement virer au rouge-violet, puis on a acidifié par HCl et extrait la quinone à l'éther. Après purification par sublimation sous une pression de 14 mmHg à 110° , nous avons obtenu 70 mg de beaux cristaux oranges de PF 178° , mais commençant à sublimer à 150° . Rendement: 50 %

Propriétés du produit:

Elles sont identiques à celles données dans la littérature pour le produit préparé par hydrolyse de l'anilido-oxytoluquinone-

anilide /45/ ou du 3-méthylamino-6-hydroxytoluquinone /46/.

PF: 178° (177° /45/, 184° /46/)

Réactions colorées: Avec H₂SO₄ conc.: Violet

Avec NaOH 2N: Violet

Avec FeCl₃/alcool: brun foncé

Spectre UV-visible:

λ des absorptions maximum:

237, 291 et 418 nm (CHCl₃) Litt. /47/: 282 et 420 nm

Chromatographie: (syst. 2)

R_f = 0,10 (litt. /48/: 0,10)

Spectre de RMN: Solvant: DMSO d₆

-CH₃ δ = 2,83 Int.: 3,3

-H δ = 5,93 1

Spectre de masse (70 eV)

Masse moléculaire: 154

Pics caractéristiques:

m/e	154 (M ⁺)	126	98	97	85	80	71	69
%	100	4,8	6,2	4,2	12,7	10,0	8,1	0,9

Dérivé acétylé:

Nous avons préparé le tétraacétoxytoluène par acétylation réductrice du produit précédent avec l'anhydride acétique en présence de poudre de Zn et de pyridine, selon la méthode décrite par Posternak /4/. Cristaux incolores de PF 195° (litt.: /49/ 198)

Spectre de RMN: Solvant: DMSO d₆

-CH₃ δ = 2,01 Int.: 3,01

-OCOCH₃ δ = 2,32 11,54
δ = 2,38

-H δ = 7,34 1

3.8.3.2. 2,3,5,6-tétrahydroxytoluène (24)

50 mg de dihydroxytoluquinone sont suspendus dans quelques

ml de dithionite 1N et agités jusqu'à dissolution et décoloration complètes. Le produit est extrait à l'acétate d'éthyle. Son évaporation laisse un résidu collant qui est séché, repris par le minimum d'éther sec et précipité par l'éther de pétrole. On obtient ainsi une poudre brun-clair, très oxydable et qui se colore immédiatement en rouge en solution aqueuse. Le produit s'oxyde également à l'état solide et il se forme des cristaux oranges de dihydroxytoluquinone sur les parois de tube dans lequel il est conservé. Rendement: 60 %

PF: 165°

Insoluble dans le benzène et CHCl_3

Spectre de RMN: Solvant: DMSO d_6

-CH ₃	$\delta = 2,01$	Int.: 2,94
-H	$\delta = 6,27$	1
-OH	$\delta = 7,40$	3,84 (pic très étalé)

Spectre de masse: (masse moléculaire: 156) (70 eV)

Pics caractéristiques:

m/e:	156	155	154	139	138	137	127	126	110
%	100	19,5	15,2	2,0	1,1	2,6	3,2	1,5	3,0

Le produit contient probablement un peu de quinone, bien que nous ayons tenté de l'en débarrasser par sublimation (de la quinone). Vu son instabilité, il n'a pas été analysé, mais nous avons préparé son dérivé acétylé qui s'est révélé identique au produit décrit à la page précédente.

3.9. 2,6,2',6'-TETRAHYDROXY-4,4'-DIMETHYLBIPHENYL (Tétrahydroxybitolyl) (VIII)

3.9.1. Essais préliminaires

Posternak et col. /5/ avaient préparé autrefois la 4-amino-diméthylorcine (29) par l'intermédiaire de la nitration de l'orcino1, réaction qui ne donne qu'environ 10 % de l'isomère désiré. Nous avons

donc cherché une autre voie de préparation de la 4-iododiméthylorcine (33) et du tétraméthoxybitolyl (34).

En vue du couplage des noyaux benzéniques, nous avons essayé d'ioder ou de bromer l'orcinol ou son dérivé diméthylé par plusieurs méthodes:

Sans succès: Action de I_2 dans le $CHCl_3$ en présence de CF_3COOAg /50, 51/
 Action de I_2 dans l'éther en présence de PbO_2 /52/
 Iodation par ICl dans CCl_4 /53/

Avec de mauvais rendements: Voie A

Avec de bons rendements: Voie B

3.9.2. 4-iododiméthylorcine par la voie A /54/

L'orcinol est carboxylé par l'action du CO_2 sous une pression de 50 atm. à 200° en présence de K_2CO_3 solide (rendement: 85 % PF: 158° , litt.: $160-161^\circ$). L'acide p-orsellinique (25) est complètement méthylé par le sulfate de méthyle en milieu NaOH 30 % (rendement: 80 %, PF: 82° , litt.: $82-84^\circ$), puis l'ester est saponifié par KOH 40 % à 100° pendant 10 heures pour donner l'acide diméthyl-p-orsellinique (27) avec un rendement de 86 % (PF: 178° , litt.: 178°).

A partir de l'acide diméthyl-p-orsellinique ainsi obtenu, nous avons essayé plusieurs méthodes pour préparer la 4-aminodiméthylorcine (29).

3.9.2.1. Réaction d'Hoffmann

Nous avons préparé le chlorure d'acide en faisant réagir le produit avec PCl_5 à 60° pendant 1 heure dans le benzène, puis l'amide correspondante en faisant passer un courant de NH_3 dans la solution /54/. PF de l'amide (28): 198° , litt.: 199°)

Transformation en amine: 500 mg d'amide sont agitées avec une solution de NaOCl 1N pendant 40 heures, puis la solution est ex-

traite à l'éther. L'amine est séparée du résidu par sublimation et ce résidu composé principalement d'amide non transformée est recyclé. Le rendement de cette réaction étant très mauvais, nous l'avons abandonnée (quelques mg d'amine impure, rouge).

3.9.2.2. Réaction de Curtius

Le chlorure d'acide préparé comme ci-dessus, dissous dans 10 ml de benzène, est traité par du NaN_3 activé /55/. A partir de 1 g. d'acide, nous avons obtenu 120 mg d'amine impure, rouge (rendement: 14 %).

3.9.2.3. Réaction de Schmidt

On dissout 1 g. d'acide dans 10 ml d' H_2SO_4 conc. et on traite par 1,1 g. de NaN_3 dissous dans le minimum d'eau, goutte à goutte, sous agitation, en gardant la température à 0° . On laisse reposer une nuit, puis on hydrolyse en versant sur de la glace pillée et on libère l'amine par addition de NaOH . A partir de 1 g. d'acide, nous avons obtenu 120 mg d'amine sublimée, mais impure, sous forme de cristaux violets. (Rendement: 14 %)

L'amine peut être transformée en dérivé iodé par traitement à l'acide nitreux et KI , selon la méthode décrite par Posternak /5/.

3.9.3. 4-iododiméthylorcine par la voie B

3 g. (20 mMol) de diméthylorcine sont traités à 0° par 40 mMol de n-butyllithium dans l'éther, sous courant d'azote, et laissés 3 jours à $+4^\circ$ dans un flacon bien bouché. L'éther est ensuite évaporé et le résidu pâteux est repris par un peu de tétrahydrofurane (THF) et traité goutte à goutte par une solution de 10 g. d'iode (40 mMol) dans 20 ml de THF. La réaction est très violente et le solvant se met immédiatement à bouillir. Une fois que tout l'iode a été ajouté, on maintient encore 1/4 d'heure à l'ébullition à reflux, puis on laisse refroidir, on évapore le THF, on reprend par de l'eau, on élimine l'excès

d'iode en ajoutant le volume nécessaire de NaHCO_3 1N et on extrait le produit à l'éther. L'évaporation de l'éther laisse un résidu cristallin brun que l'on recristallise 2 fois dans le minimum d'alcool à 95 %.

PF: 96-97° (litt.: 98) Rendement: 3,6 g. (65 %)

3.9.4. Tétrahydroxybitolyl (VIII)

Le couplage de la 4-iododiméthylorcine a été effectué à 200° en présence de poudre de Cu (réaction d'Ullmann) /5/ et nous avons obtenu le 2,6,2',6'-tétraméthoxy-4,4'-diméthylbiphényl (tétraméthoxybitolyl)(34) avec un rendement de 80 %. PF: 142-4°, litt.: 145°

Le tétrahydroxybitolyl a été préparé par déméthylation du produit précédent au BBr_3 selon la méthode habituelle (p. 37) et purifié par sublimation. A partir de 200 mg de tétraméthoxybitolyl, nous avons obtenu 150 mg de tétrahydroxybitolyl de PF 198° (litt.: 200) Rendement: 92 %

3.10. ACIDE 2,6,2',6'-TETRAHYDROXY-4,4'-DIMETHYLBIPHENYL-3,3'-DICARBOXYLIQUE (Acide tétrahydroxybitolyl-dicarboxylique) (IX)

Nous avons essayé plusieurs voies de préparation de ce produit. Le traitement direct par le butyllithium et CO_2 ayant échoué, nous avons essayé des voies détournées, pour finalement obtenir les meilleurs résultats par la carboxylation directe du tétrahydroxybitolyl par le carbonate de méthyl-magnésium (MMC).

3.10.1. Voie A (MMC)

50 mg de tétrahydroxybitolyl et 2 ml de solution de MMC préparé selon Finkbeiner et Stiles /56/ sont chauffés pendant 4 heures à 120° dans un tube scellé. Le mélange de réaction est ensuite repris par une solution de HCl 6N et le produit extrait à l'éther. Après évaporation du solvant, le résidu est repris par un peu d'alcool et une goutte de HCl conc., évaporé à sec, repris par le minimum d'éther sec et précipité par l'éther de pétrole. A partir de 50 mg, on obtient 25

à 30 mg d'acide (rendement: 44-47 %) identique par toutes ses propriétés et son dérivé hexaméthylé au produit analysé (préparé par la voie C)

3.10.2. Voie B

3.10.2.1. Diiodotétraméthoxybitolyl

Les essais d'iodation directe du tétraméthoxybitolyl ayant échoué, nous avons préparé successivement le dinitro- et le diamino-tétraméthoxybitolyl (36 et 37) d'après la méthode décrite par Posternak /5/, pour transformer le dernier produit en dérivé iodé.

100 mg d'amine (37) sont dissous dans une solution de 0,066 ml de H_2SO_4 conc. dans 0,9 ml d'eau et traités à 0° par la quantité théorique d'une solution de $NaNO_2$ 4N. A cette solution de sel de diazonium on ajoute en agitant une solution de 450 mg de KI dans 1 ml d'eau. Il se forme immédiatement un précipité brun. La suspension est chauffée 20 min. au bain-marie et une huile noire se sépare, qui se solidifie au refroidissement. Le produit extrait au $CHCl_3$ est purifié par chromatographie sur plaques (Syst. 1) et recristallisé dans l'alcool absolu. A partir de 1 g. d'amine, nous avons obtenu 965 mg de dérivé iodé (rendement: 59 %)

PF: $221-2^\circ$

Spectre de RMN: (Solvant: $CDCl_3$)

$-CH_3$	$\delta = 2,53$	Int.: 3
$-OCH_3$	$\delta = 3,47$	3
	$\delta = 3,72$	3
$-H$	$\delta = 6,76$	0,8

Analyse élémentaire:

Calculé: C = 39,00 % H = 3,65 % I = 45,80 %

Trouvé: C = 39,16 % H = 3,88 % I = 45,62 %

3.10.2.2. Acide tétraméthoxybitolyl-dicarboxylique (39)

50 mg de dérivé iodé sont dissous dans 1 ml de THF et traités par 2 fois la quantité théorique de n-butyllithium, laissés à réagir une nuit à la chambre froide, puis jetés sur un mélange éther-glace sèche pillée. Après élimination complète de CO_2 , la solution éthérée est extraite par une solution diluée de Na_2CO_3 et l'acide est précipité par HCl 6N. On obtient ainsi un mélange d'acide mono- et dicarboxylique que l'on sépare par chromatographie sur plaques. A partir de 200 mg de dérivé iodé, nous avons obtenu 15 mg de chacun des deux acides (Rendement: 6,5 et 6 %) que nous avons recristallisé en les dissolvant dans le minimum d'alcool bouillant et en ajoutant de l'eau bouillante jusqu'à l'apparition d'un léger trouble.

PF: mono: $212-5^\circ$
di: 242°

Analyse élémentaire:

mono: calculé: C = 65,90 H = 6,40

trouvé: C = 65,98 H = 6,35

di: calculé: C = 61,54 H = 5,64

trouvé: C = 61,60 H = 5,78

3.10.3. Voie C

3.10.3.1. Tétrahydroxybitolyl-dialdéhyde

Le dérivé dialdéhydrique du 2,6,2',6'-tétrahydroxy-4,4'-diméthylbiphényl a été préparé par la méthode habituelle (voir triméthoxytolualdéhyde, p. 40) et recristallisé comme l'acide ci-dessus.

PF instantané: 324°

Analyse élémentaire:

Calculé: C = 63,57 H = 4,67

Trouvé: C = 63,63 H = 4,68

3.10.3.2. 2,6,2',6'-tétraméthoxy-4,4'-diméthylbiphényl-3,3'-dialdéhyde

Le produit a été préparé comme le produit précédent à partir de 2,6,2',6'-tétraméthoxybitolyl-4,4' et recristallisé dans l'alcool absolu.

PF: 177-8°

Spectre de RMN: (Solvant: DMSO d₆)

-CH ₃	δ = 1,72	Int: 5,4
-OCH ₃	δ = 3,64	5,8
	δ = 3,95	6
-H	δ = 6,68	2
-CHO	δ = 10,75	2

Analyse élémentaire:

Calculé: C = 67,02 H = 6,19

Trouvé: C = 67,11 H = 6,18

3.10.3.3. Acide 2,6,2',6',tétraméthoxy-4,4'-diméthylbiphényl-3,3'-di-carboxylique

L'aldéhyde précédent a été oxydé par KMnO₄ dans l'acétone par la méthode habituelle (voir p. 41) et purifié par recristallisation dans le mélange eau-alcool. Rendement: 46 %. Toutes les caractéristiques du produit sont identiques à celles de l'acide préparé par la voie B (p. 51).

Dérivé méthylé: Il a été préparé par méthylation de l'acide précédent par le sulfate de méthyle dans l'acétone en présence de K₂CO₃ et recristallisé dans l'alcool absolu.

Aiguilles incolores, PF: 182-4

Spectre de RMN: (Solvant: CDCl₃)

-CH ₃	δ = 2,41	Int.: 5,8
-COOCH ₃	δ = 3,49	6
-OCH ₃	δ = 3,76	6
	δ = 3,92	5,8
-H	δ = 6,65	2

Analyse élémentaire:

Calculé: C = 63,20 H = 6,20

Trouvé: C = 63,07 H = 6,22

3.10.3.4. Acide 2,6,2',6'-tétrahydroxy-4,4'-diméthylbiphényl-3,3'-di-carboxylique

La déméthylation de l'acide précédent a été conduite de la manière habituelle (méthode p. 41) à quelques détails près:

L'acide de départ n'étant pas soluble dans CH_2Cl_2 ni dans aucun des solvants inertes vis à vis du BBr_3 , nous avons simplement agité une suspension d'acide à démétayer dans 2 ml de BBr_3 pendant 4 jours. A partir de 90 mg de produit de départ, nous avons obtenu 57 mg d'acide tétrahydroxybitolyl-dicarboxylique brut. Malheureusement, nous n'avons jamais pu reproduire cette réaction avec de tels rendements (71 %)

Après purification par chromatographie sur plaques, nous avons obtenu 35 mg de produit pur, légèrement brun.

Caractéristiques:

PF: 220° avec décomposition (dégagement de bulles)

Réaction violet très intense avec FeCl_3

Spectre de RMN: (solvant: CD_3OD)

-CH₃ $\delta = 2,59$ Int.: 3

-H $\delta = 6,45$ Int.: 1

-OH
-COOH (Déplacés par CD_3OD)

Spectre de masse: (70 eV)

Masse moléculaire: 334

Pics caractéristiques:

m/e	290	272	255	246	228	109
-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----

%	7,9	13,8	34,2	84,2	48,7	100
---	-----	------	------	------	------	-----

Analyse élémentaire:

Calculé: C = 57,50 % H = 4,19 %

Trouvé: C = 57,54 % H = 4,36 %

3.11. PHOENICINE

Nous avons préparé le 2,6,2',6'-tétrahydroxy-4,4'-diméthylbiphényl (VIII) par la méthode décrite précédemment (p. 49) et effectué l'oxydation au moyen du nitrosodisulfonate de potassium, selon la méthode de Musso et col. /6/ et obtenu le pigment avec les rendements indiqués.

3.12. OOSPOREINE, 2,5,2',5'-TETRAHYDROXY-4-METHYLDIBENZOQUINONE (pyxiférine), 2,5,2',5'-TETRAHYDROXYDIBENZOQUINONE

3.12.1. 1-iodo-2,3,5,6-tétraméthoxybenzène, 4-iodo-2,3,5,6-tétraméthoxytoluène

Nous avons préparé par traitement au n-butyllithium, puis à l'iode, selon la méthode habituelle (p. 48), à partir du 1,2,4,5-tétraméthoxybenzène et du 2,3,5,6-tétraméthoxytoluène, les deux dérivés iodés correspondants. Ces deux produits ont été purifiés par chromatographie sur plaques et recristallisés dans le minimum de méthanol.

Caractéristiques des produits:

1-iodo-2,3,5,6-tétraméthoxybenzène

PF: 89°

Rendement: 70 %

Spectre de RMN: (solvant: CDCl_3)

$-\text{OCH}_3$	$\delta = 3,85$	Int.: 6
	$\delta = 3,76$	6
$-\text{H}$	$\delta = 6,62$	1

Analyse élémentaire:

Calculé: C = 37,07 H = 4,40 I = 38,80

Trouvé: C = 36,95 H = 4,27 I = 38,65

4-iodo-2,3,5,6-tétraméthoxytoluène

PF: 87°

Rendement: 51 % (à partir du tétraméthoxybenzène)

Spectre de RMN: (solvant: CDCl_3)

$-\text{CH}_3$ $\delta = 2,13$ Int.: 3

$-\text{OCH}_3$ $\delta = 3,80$ 12

Analyse élémentaire:

Calculé: C = 39,10 % H = 4,47 % I = 37,50 %

Trouvé: C = 39,10 % H = 4,57 % I = 37,38 %

3.12.2. 2,3,5,6,2',3',5',6'-octaméthoxybiphényle (44)

2,3,5,6,2',3',5',6'-octaméthoxy-4-méthylbiphényle (45)

2,3,5,6,2',3',5',6'-octaméthoxy-4,4'-diméthylbiphényle (octaméthyl-
leuco-oosporéine) (46)

Le mélange équimoléculaire des deux produits précédents ont été couplés par la méthode d'Ullmann (p. 49). Nous avons obtenu ainsi le mélange des dérivés octaméthylés des trois pigments, que nous avons séparés par chromatographie sur plaques et recristallisés dans le méthanol. A partir de 613 mg d'iodotétraméthoxytoluène et 600 mg d'iodotétraméthoxybenzène, nous avons obtenu 163 mg d'octaméthoxybiphényle (27,7 %), 248 mg de méthyl octaméthoxybiphényle (35 %) et 138 mg de diméthyl octaméthoxybiphényle (20,6 %)

Caractéristiques des produits:

Octaméthoxybiphényle:

PF: 169°

Spectre de RMN: (solvant: CDCl_3)

$-\text{OCH}_3$ $\delta = 3,65$ Int.: 5,6

$\delta = 3,87$ 5,8

$-\text{H}$ $\delta = 6,63$ 1

Analyse élémentaire:

Calculé: C = 60,90 % H = 6,92 %

Trouvé: C = 61,11 % H = 6,71 %

Méthyl octaméthoxybiphényle

PF: 158°

Spectre de RMN: (solvant: CDCl_3)

$-\text{CH}_3$ $\delta = 2,20$ Int.: 3

-OCH ₃	$\delta = 3,58$	Int.: 13,5
	$\delta = 3,78$	13
	$\delta = 3,82$	
-H	$\delta = 6,57$	1

Analyse élémentaire:

Calculé: C = 61,78 % H = 6,92 %

Trouvé: C = 61,76 % H = 6,84 %

Octaméthylleuco-oosporéine:

PF: 178°

Spectre de RMN: (Solvant: CDCl₃)

-CH ₃	$\delta = 2,20$	Int.: 6
-OCH ₃	$\delta = 3,59$	12,6
	$\delta = 3,78$	12,8

Analyse élémentaire:

Calculé: C = 62,54 % H = 7,16 %

Trouvé: C = 62,62 % H = 7,18 %

3.12.3. Oosporéine, 2,5,2',5'-tétrahydroxy-4-méthylidibenzoquinone
2,5,2',5'-tétrahydroxydibenzoquinone (XIII, XII et XI)

Les trois dérivés octaméthylés ont été déméthylés par le BBr₃ selon la méthode décrite précédemment (p. 44) et les pigments obtenus ont été purifiés par trois recristallisations dans le dioxane.

Les trois pigments ne présentent pas de point de fusion, mais se décomposent (noircissement) lentement à partir de 300°. Nous avons préparé les dérivés leuco-octaacétylés par traitement à l'anhydride acétique en présence de poudre de Zn et de pyridine.

Caractéristiques des produits et dérivés:

Oosporéine:

Les spectres UV (λ max. à 231 et 288 nm), IR et de RMN sont identiques à ceux de l'oosporéine d'origine biologique, de même que le dérivé acétylé (PF: 250°, litt.: 237°) /7, 57/

2,5,2',5'-tétrahydroxy-4-méthylidibenzoquinone (pyxiférine):

Aspect identique à l'oosporéine (cristaux oranges)

Spectre UV: max. à 226, 286 et 420 nm (CHCl₃)

Spectre de RMN: (solvant: DMSO d₆)

-CH ₃	δ = 1,83	Int.: 3
-H	δ = 5,90	1
-OH	δ ---	

Analyse élémentaire:

Calculé: C = 53,40 % H = 2,75 %

Trouvé: C = 53,28 % H = 3,35 %

Dérivé acétylé: PF: 204-5°

Spectre de RMN: (solvant: CDCl₃)

-CH ₃	δ = 2,02	Int.: 3	Tot.: 27
-OCOCH ₃	δ = 2,10, 2,25, 2,30		
-H	δ = 7,38	1	

Analyse élémentaire:

Calculé: C = 55,1 % H = 4,43 %

Trouvé: C = 55,18 % H = 4,61 %

2,5,2',5'-tétrahydroxy-dibenzoquinone

Aspect identique aux 2 pigments précédents

Spectre UV: max. à 224, 283 et 420 nm

Analyse élémentaire:

Calculé: C = 51,8 % H = 2,15 %

Trouvé: C = 51,98 % H = 2,24 %

Spectre de RMN: (Solvant: DMSO d₆)

-H	δ = 5,91	Int.: --
-OH	δ = 8,30	--

Dérivé acétylé: PF : 256-8

Spectre de RMN: (solvant: CDCl₃)

-H	δ = 7,39	Int.: 1
-OCOCH ₃	δ = 2,09	6
	δ = 2,28	6

Analyse élémentaire:

Calculé: C = 54,4 % H = 4,21 %

Trouvé: C = 54,46 % H = 4,39 %

D E U X I E M E P A R T I E

Etude de la biosynthèse de la phoenicine et

de l'oosporéine

Culture des microorganismes

Préparation des précurseurs marqués

Essais d'incorporation

1. INTRODUCTION

Nous avons choisi comme microorganisme produisant les pigments, pour l'étude de leur biosynthèse, *Penicillium phoeniceum* van Beyma pour la phoenicine et *Chaetomium aureum* Chivers pour l'oosporéine.

Il a été établi par de précédents travaux /9, 13, 17, 18, 57/ que la voie de l'acétate est utilisée par les deux microorganismes, à l'exclusion de tout autre (mévalonate ou shikimate), et que le premier intermédiaire aromatique est l'acide orsellinique (IV).

Parmi les précurseurs que nous avons étudié, certains jouent un rôle ou sont des produits de biosynthèse chez d'autres microorganismes. C'est en particulier le cas de l'acide orsellinique, isolé chez de nombreux microorganismes, par exemple *Aspergillus fumigatus* /58/, *Aspergillus terreus* /59/, *Penicillium madriti* /36/, *Chaetomium chochliodes* /60/, du 2,3,5,6-tétrahydroxytoluène ou de la quinone correspondante chez *Aspergillus fumigatus* /47, 61, 62/ et comme produit de dégradation de diverses actinomycines /63/, et du 2,3,5-trihydroxytoluène chez *Aspergillus fumigatus* et *Penicillium spinulosum* /61, 62, 64, 65/.

L'acide hydroxyorsellinique a été trouvé comme constituant d'un tridepside, "Hiascinsäure", isolé à partir d'un lichen, *Cetraria hiascens* /43/. Les autres précurseurs étudiés n'ont à notre connaissance pas été découverts dans la nature.

2. CONDITIONS DE CULTURE DES MICROORGANISMES

2.1. Culture de *Penicillium phoeniceum*

Nous avons cultivé ce microorganisme sur un milieu Czapek-Dox acide, légèrement modifié /18/ par rapport à celui de Curtin et col. /66/. Il contient par litre de solution:

Glucose	50 g.
NaNO ₃	2 g.
KH ₂ PO ₄	1 g.
KCl	0,5 g.
MgSO ₄ ·7 H ₂ O	0,5 g.
FeSO ₄ ·4 H ₂ O	0,02 g.
ZnSO ₄ ·7 H ₂ O	0,22 mg
CuSO ₄ ·5 H ₂ O	0,749 mg

Les cultures ont été faites dans des flacons d'Erlenmeyer des 200 ml contenant chacun 50 ml de milieu, à 25°, dans l'obscurité. La pigmentation commence environ 10 jours après l'inoculation par des fragments de mycéliums, et atteint son maximum après 8 jours supplémentaires.

2.2. Culture de *Chaetomium aureum*

Du fait que lors de travaux précédents, ce microorganisme a été cultivé sur un milieu contenant de l'extrait de pomme de terre et que cet extrait empêche le dosage du pigment à cause des phénols qu'il contient, nous avons dû mettre au point un milieu de culture synthétique.

Nous avons adopté comme milieu de base un dérivé de celui de Czapek-Dox, où le nitrate a été remplacé par de l'asparagine, ce microorganisme ne poussant pas avec le nitrate comme seule source d'azote.

Le milieu de base que nous avons préparé contient par litre d'eau bi-distillée:

Glucose	50 g.
dl-asparagine	7 g.
KH_2PO_4	1 g.
$\text{MgSO}_4 \cdot 7 \text{ H}_2\text{O}$	0,5 g.
Pantothénate de Ca	4 mg

A partir de ce milieu de base, nous avons étudié l'effet de différents métaux, en particulier le Cu et le Zn, ainsi que le Fe, sur la croissance et le pigmentogénèse du champignon. A cet effet, nous avons cultivé le microorganisme sur ce milieu en présence de toutes les combinaisons possibles de ces trois métaux et mesuré d'une part la croissance en pesant les mycéliums séchés, d'autre part la pigmentation en dosant le pigment dans le milieu (méthode de dosage p.65). Nous n'avons pas tenu compte pour cette étude du pigment contenu dans les mycéliums, d'ailleurs en faible quantité.

Conditions de culture:

Température: 25^0

Durée: 12 jours

Métaux: $\text{FeSO}_4 \cdot 4 \text{ H}_2\text{O}$	0,02 g/l	$8,9 \cdot 10^{-5} \text{ M}$
$\text{ZnSO}_4 \cdot 7 \text{ H}_2\text{O}$	0,22 mg/l	$3 \cdot 10^{-8} \text{ M}$
$\text{CuSO}_4 \cdot 5 \text{ H}_2\text{O}$	0,218 mg/l	$7,6 \cdot 10^{-7} \text{ M}$

Les résultats des essais sont donnés dans le tableau de la p. 63. La croissance et la coloration des mycéliums dépend fortement de la présence ou de l'absence de ces métaux. Nous avons pris comme référence la croissance sur le milieu à base d'extrait de pommes de terre. Avec ce milieu, les mycéliums sont très peu colorés (jaune pâle) et poussent lentement au début, Sur les milieux synthétiques, les mycéliums sont plus dorés (jaune foncé à orange) et leur croissance est plus rapide au début, mais s'arrête plus vite. Quant aux milieux, ils peuvent être diversement colorés: En présence de Fe, ils commencent par se colorer de vert, dans les autres cas de jaune ou de rose. Outre la

Résultats des essais:

Métaux	Poids des mycéliums *	Oosporéine dosée *
Sans adjonction	0,51 g.	10,2 mg
Cu	0,60	11,5
Fe	0,96	16,2
Zn	0,51	24,0
Fe + Zn	1,48	61,25
Fe + Cu	1,0	16,5
Cu + Zn	0,89	24,2
Fe + Cu + Zn	1,78	55,2
ER **	1,10	35,5
ER + Fe + Cu + Zn	2,10	96,2
Ref. ***	2,42	235 mg

* Résultats pour 5 cultures, c'est à dire 250 ml de milieu

** Milieu de base préparé avec de l'eau du robinet

*** Milieu à base d'extrait de pommes de terre "Difco" (4 %) et de glucose (2 %). Pour cet essai, comme on ne peut pas doser le pigment par la méthode habituelle en présence d'extrait de pommes de terre, nous avons évalué la quantité de pigment produite en précipitant celui-ci par HCl et en le pesant

coloration, les mycéliums se présentent sous différents aspects: humides avec une tendance à couler (sans adj., Zn, Fe + Cu) ou au contraire épais, bien secs et flottant en surface (Fe + Zn, Fe + Cu + Zn, ER + Fe + Cu + Zn).

Il ressort des résultats ci-dessus que le Zn et le Fe sont nécessaires tant à la croissance qu'à la pigmentogénèse, comme chez *Penicillium phoeniceum*. En revanche, s'il a été établi lors de précédents travaux effectués dans notre laboratoire /18/ que le Cu est nécessaire au développement de *Penicillium phoeniceum*, il ne semble pas avoir

d'influence ici. Afin de mettre ce fait en évidence, nous avons fait des cultures de *Chaetomium aureum* sur le milieu contenant Fe et Zn avec différentes concentrations de Cu et nous avons obtenu les résultats suivants:

Conc. Cu ⁺⁺	Oosporéine pesée	Conc. Cu ⁺⁺	Oosporéine pesée
0	552 mg	10 ⁻¹⁰ M	456 mg
10 ⁻¹⁰ M	440 mg	10 ⁻⁸ M	480 mg
		10 ⁻⁶ M	346 mg

Ce tableau montre que le Cu n'est pas nécessaire à la croissance et à la pigmentation. A certaines concentrations relativement élevées, il semble même les ralentir. Nous avons donc renoncé au Cu pour les essais d'incorporation.

Autres essais:

Comme la croissance est beaucoup plus forte sur le milieu contenant de l'extrait de pommes de terre, nous avons essayé, afin de déterminer si le facteur de croissance contenu dans cet extrait était minéral, de cultiver le microorganisme sur le milieu sans les métaux, mais en présence de cendres provenant de la calcination de l'extrait de pommes de terre, mais nous n'avons pas noté d'amélioration sensible.

A la lumière de ces essais, nous avons choisi pour les essais d'incorporation le milieu contenant Fe + Zn, préparé avec de l'eau du robinet, qui contient, semble-t-il, un élément de croissance du microorganisme, élément dont nous n'avons toutefois pas pu déterminer la nature. Certains essais d'incorporation ont été effectués avant cette étude, avec le milieu préparé à l'eau bidistillée. La faible pigmentation du microorganisme dans ces conditions peut-être expliquer les différences d'incorporation trouvées d'un essai à l'autre, en particulier pour l'acide orsellinique et le trihydroxytoluène. Il semble en effet que les rendements d'incorporation dépendent dans une grande mesure de la

quantité de pigment produite, alors que la radioactivité spécifique du pigment varie peu d'un essai à l'autre. C'est pourquoi il nous a semblé intéressant de donner dans le tableau des résultats la radioactivité spécifique des pigments à côté des rendements d'incorporation totale.

3. EXTRACTION ET DOSAGE DES PIGMENTS

3.1. Phoenicine

Une fois que la culture du microorganisme a atteint le maximum de pigmentation, nous avons filtré les mycéliums sur buchner, puis nous les avons lavés à l'eau, bien essorés, séchés 3 jours au dessiccateur sous vide et pesés.

Après acidification du filtrat par quelques ml d'HCl 6N, nous l'avons ajusté à 250 ml avec de l'eau (pour 4 cultures) et nous en avons prélevé quelques ml en vue du dosage.

Le reste de la solution a été extrait 4 fois par 50 ml de chloroforme et la solution chloroformique jaune foncé a été séchée sur Na_2SO_4 anhydre et évaporée à sec, laissant un résidu brun de phoenicine brute. Par recristallisation dans le minimum d'alcool absolu, on obtient une poudre jaune de cristaux très fins de phoenicine pure.

Pour 4 cultures, on obtient ainsi entre 50 et 80 mg de phoenicine recristallisée.

Dosage:

Pour le dosage du pigment dans le milieu, la solution à doser est tout d'abord diluée avec de l'eau de manière à ce qu'elle ait une concentration comprise entre 25 et 80 γ/ml . Un échantillon de 1 ml de cette nouvelle solution est additionné de 10 ml de Na_2CO_3 1N et de 1 ml de réactif de Folin. Après 1/4 d'heure, on mesure l'extinction à 766 nm par rapport à une solution-contrôle préparée dans les mêmes conditions à partir du milieu de culture stérile, dilué dans les mêmes proportions, et on la compare à une courbe d'étalonnage.

3.2. Oosporéine

La filtration et la préparation de la solution à doser se fait de la même manière que pour la phoenicine. Une fois l'échantillon prélevé pour le dosage du pigment, l'isolement de ce dernier se fait de la manière suivante:

La solution est évaporée sous vide jusqu'à l'obtention d'un liquide sirupeux (~30 ml). On reprend par un peu d'eau et on laisse une nuit à +4°. On obtient ainsi un précipité brun foncé d'oosporéine brute que l'on sépare du liquide par centrifugation et que l'on reprend par de l'eau et recentrifuge 4 fois. Le pigment est finalement séché sous vide et recristallisé dans le dioxane. On obtient également entre 50 et 80 mg d'oosporéine recristallisée pour 4 cultures.

Le dosage de l'oosporéine dans le milieu est identique à celui de la phoenicine.

4. COMPTAGES DES PRODUITS MARQUES

Les échantillons de produits à compter ont été dissous dans 10 ml de solution de Bray /67/ et comptés par scintillation liquide au moyen d'un appareil Beckmann LS 250.

Les rendements de comptage indiqués pour cet appareil sont de 90 % pour le ^{14}C et de 50 % pour le ^3H .

5. PREPARATION DES PRECURSEURS MARQUES

5.1. Introduction

Les méthodes de préparation de ces produits ont été décrites en détail dans la première partie de ce travail. Nous nous bornerons donc à indiquer la voie choisie, à décrire brièvement les méthodes, en particulier quand l'introduction du marquage change quelque détail, et à donner les rendements isotopiques de ces synthèses et la radioactivité spécifique des produits obtenus.

Du fait que nous n'avons pas compté tous les produits préparés, les rendements isotopiques indiqués sont des rendements globaux pour une série de réactions:

$$\text{Rend. isot.} = \frac{\text{Radioactivité tot. du prod. final}}{\text{Radioactivité tot. du prod. de départ}}$$

Ces rendements sont bien entendu très approximatifs lorsque le produit de départ est le $^{14}\text{CH}_3\text{I}$, vu les difficultés de calculer la quantité employée.

Certains produits ont été préparés plusieurs fois, ce qui explique des différences dans la radioactivité spécifique de produits dérivant apparemment directement les uns des autres, par exemple le 2,3,5-trihydroxytoluène et l'acide hydroxyorsellinique.

La pureté des précurseurs a été contrôlée par chromatographie sur couche mince de SiO_2 et la radioactivité des plaques contrôlée par passage sous un compteur Berthold CB 2723. Les produits ont été purifiés par chromatographie ou sublimation jusqu'à l'obtention d'un seul spot radioactif sur la plaque de chromatographie.

5.2. Acétoacétate de lithium-3- ^{14}C (I)

Le sel de lithium a été préparé par saponification de l'acétoacétate d'éthyle-3- ^{14}C selon la méthode de Hall /32/.

Rendement isotopique: 63 %

Radioactivité spécifique: 13,9 $\mu\text{Ci/mMol}$

0,129 $\mu\text{Ci/mg}$

5.3. Orcinol-3- ^{14}C (II)

Nous avons préparé l'orcinol-3- ^{14}C par décarboxylation de l'acide orsellinique au moyen de HCl dilué, selon la méthode de Birkinshaw et col. /36/.

Rendement isotopique: 85 %

Radioactivité spécifique: 14,8 $\mu\text{Ci/mMol}$

0,120 $\mu\text{Ci/mg}$

5.4. Aldéhyde orsellinique-2- ^{14}C (III)

Nous avons préparé à partir de 300 mg d'orcinol-3- ^{14}C , par la méthode habituelle, décrite p. 40, 310 mg d'aldéhyde orsellinique-2- ^{14}C , de PF 182°.

Rendement isotopique: 63 %

Radioactivité spécifique: 4,6 $\mu\text{Ci/mMol}$

0,030 $\mu\text{Ci/mg}$

5.5. Acide orsellinique-2- ^{14}C (IV)

Nous avons préparé l'acide 2,4-dihydroxy-6-méthylbenzoïque-2- ^{14}C par la méthode décrite précédemment: Condensation de l'acétoacétate d'éthyle-3- ^{14}C avec le crotonate d'éthyle, puis bromation du produit obtenu, saponification et réduction en acide orsellinique.

Rendement isotopique: 7 % à partir de l'acétoacétate d'éthyle

Radioactivité spécifique: 14,2 $\mu\text{Ci/mMol}$

0,084 $\mu\text{Ci/mg}$

5.6. 2,3,5-trihydroxytoluène-méthyl- ^{14}C (VI)

Nous avons préparé le 2,3,5-triméthoxytoluène-méthyl- ^{14}C par

traitement de 3 g, de 1-bromo-2,3,5-triméthoxybenzène par 1 équivalent de n-butyllithium, puis par 0,75 ml de $^{14}\text{CH}_3\text{I}$ contenant 500 μCi et dilués dans 5 ml d'éther anhydre, obtenant ainsi 1,05 g. de 2,3,5-triméthoxytoluène- $^{14}\text{CH}_3$ que nous avons déméthylé par traitement au tribromure de bore.

Rendement isotopique: 19,3 % à partir de $^{14}\text{CH}_3\text{I}$

Radioactivité spécifique: 36,7 $\mu\text{Ci/mMol}$

0,26 $\mu\text{Ci/mg}$

5.7. Acide hydroxyorsellinique-méthyl- ^{14}C (V)

A partir de 2,3,5-triméthoxytoluène- $^{14}\text{CH}_3$ préparé comme ci-dessus, nous avons synthétisé l'aldéhyde hydroxyorsellinique- $^{14}\text{CH}_3$ et oxydé ce produit par KMnO_4 avant de le déméthyliser par le BBr_3

Vu la coloration du produit, nous avons compté le produit méthylé.

Rendement isotopique des deux premières réactions: 55 %

Radioactivité spécifique de l'acide 2,4,5-triméthoxytoluïque: 55,7 $\mu\text{Ci/mMol}$ 0,247 $\mu\text{Ci/mg}$

Radioactivité spécifique de l'acide hydroxyorsellinique (calculée): 55,7 $\mu\text{Ci/mMol}$ 0,303 $\mu\text{Ci/mg}$

5.8. 3,6-dihydroxytoluquinone-méthyl- ^{14}C (VII)

Nous avons traité 2,77 g. de 1,2,4,5-tétraméthoxybenzène par la quantité équivalente de n-butyllithium, puis par un léger excès de $^{14}\text{CH}_3\text{I}$ contenant 500 μCi , et obtenu le 2,3,5,6-tétraméthoxytoluène- $^{14}\text{CH}_3$ avec un rendement de 63 % par rapport au tétraméthoxybenzène et un rendement isotopique de 41 %. 400 mg de ce produit ont été déméthylés par le tribromure de bore et oxydés en 3,6-dihydroxytoluquinone, la réaction donnant 167 mg de ce produit sublimé (rendement: 57 %)

Rendement isotopique: 23 %

Pour la détermination de la radioactivité spécifique, nous avons préparé et compté le dérivé leuco-tétraacétylé, la forte coloration de la quinone ne permettant pas le comptage par scintillation.

2,3,5,6-tétraacétoxytoluène: 0,82 $\mu\text{Ci/mg}$

3,6-dihydroxytoluquinone: 265 $\mu\text{Ci/mMol}$

1,725 $\mu\text{Ci/mg}$

5.9. Acide 2,6,2',6'-tétrahydroxy-4,4'-diméthyl-biphényl-3,3'-dicarboxylique-di- ^{14}C (IX)

Nous avons préparé la diméthylorcine-méthyl- ^{14}C par traitement du 1-bromo-3,5-diméthoxybenzène au n-butyllithium, puis au $^{14}\text{CH}_3\text{I}$.

5,5 g. de bromo-3,5-diméthoxybenzène (25,3 mMol) ont été traités par 25 mMol de n-butyllithium pendant 1 heure à température ambiante, puis par 3,59 g. (1,58 ml) de CH_3I ajouté de la manière suivante: 0,5 ml de CH_3I non marqué suivi de 1 ml de $^{14}\text{CH}_3\text{I}$, contenant 2 mCi. Après avoir laissé réagir 1 heure, on ajoute encore 1 ml de CH_3I non marqué pour compléter la réaction. On laisse reposer une nuit, puis on extrait à l'éther et on distille le produit, obtenant ainsi 2 g. de diméthylorcine marquée.

Rendement: 51 % à partir du bromodiméthoxybenzène

La iododiméthylorcine-méthyl- ^{14}C a été préparée à partir du produit précédent par la méthode habituelle, c'est à dire par traitement au n-butyllithium et à l'iode. Nous en avons obtenu 900 mg après recristallisation dans l'alcool absolu.

Rendement: 25 %

Le couplage du produit précédent a été effectué de la manière habituelle (réaction d'Ullmann) et a donné 240 mg de 2,6,2',6'-tétraméthoxy-4,4'-diméthyl-biphényl que nous avons recristallisé dans l'alcool, et 63 mg que nous avons récupéré des eaux-mères et purifié par chromatographie.

Rendement: 62 % (303 mg)

La déméthylation au BBr_3 a été effectuée sur deux échantillons de 100 mg et nous avons obtenu 150 mg de 2,6,2',6'-tétrahydroxy-4,4'-diméthyl-biphényl purifié par sublimation, Rendement: 92 %

Pour les essais d'incorporation, le produit n'était pas assez pur et une partie a été sublimée une seconde fois, ce qui a donné un produit ne représentant qu'un seul spot radioactif à la chromatographie.

La carboxylation au moyen du carbonate de méthyl-magnésium

de deux fois 50 mg de tétrahydroxybitolyl a donné après purification par chromatographie 34 mg d'acide légèrement brun, mais ne présentant qu'un seul spot radioactif à la chromatographie.

Rendement: 25 %

Radioactivité spécifique: 96,6 $\mu\text{Ci}/\text{mMol}$

0,29 $\mu\text{Ci}/\text{mg}$

5.10. Acide orsellinique doublement marqué

Pour l'essai d'incorporation de l'acide orsellinique marqué à la fois au ^{14}C et au tritium, nous avons préparé d'une part le produit marqué au ^{14}C et d'autre part le produit marqué au tritium, puis nous les avons mélangés en proportions convenables et recristallisés ensemble.

Préparation de l'acide orsellinique-3,5- ^3H (Schéma p. 8)

Nous l'avons préparé par réduction de l'acide dibromo-orsellinique préparé de la manière habituelle, par traitement au n-butyllithium suivi d'hydrolyse par de l'eau tritiée.

30 mg (0,092 mMol) d'acide dibromoorsellinique ont été dissous dans 2 ml d'éther anhydre et traités par 1 mMol de n-butyllithium pendant 1/2 heure à température ambiante, puis nous avons hydrolysé en ajoutant 0,1 ml (5,55 mMol) d'eau tritiée, d'une activité de 8 mCi/ml, goutte à goutte et en agitant bien, pendant 1/4 d'heure, après quoi nous avons acidifié la solution par HCl et extrait l'acide orsellinique à l'éther et purifié celui-ci par chromatographie et recristallisation dans le mélange alcool-eau.

Rendement: 8 mg, 51 %

Rendement isotopique: 0,3 % (approximatif)

Activité spécifique: 44,27 $\mu\text{Ci}/\text{mMol}$

0,264 $\mu\text{Ci}/\text{mg}$

Préparation et comptages du produit doublement marqué:

Nous avons mélangé des quantités à peu près égales des deux

produits que nous avons dissous dans un peu de NaHCO_3 1M et reprécipités par HCl .

Comptages:

Nous avons compté séparément les acides marqués au ^{14}C et au tritium, puis le mélange afin de déterminer le rapport des activités du ^{14}C et du tritium dans le canal ^3H , où il y a interférence. Les résultats des comptages sont donnés dans le tableau ci-dessous, en cpm rammenés à 1 mg de produit.

PRODUIT	C A N A U X		
	^3H	^{14}C	$^3\text{H}-^{14}\text{C}$
Acide orsellinique- ^3H	<u>289800</u>	--	290800
Acide orsellinique- ^{14}C	49300	95500	<u>167200</u>
Acide orsellinique- $^3\text{H}-^{14}\text{C}$	168200	55100	234500
dont dus à ^3H	<u>139800</u>	--	140000
dont dus à ^{14}C	28400	55100	<u>94500</u>

$$\text{Rapport } \frac{\text{cpm-}^3\text{H}}{\text{cpm-}^{14}\text{C}} = \frac{129800}{94500} = 1,47$$

Radioactivité spécifique du ^{14}C : 8,1 $\mu\text{Ci/mMol}$
0,048 $\mu\text{Ci/mg}$

Radioactivité spécifique du ^3H : 21,35 $\mu\text{Ci/mMol}$
0,127 $\mu\text{Ci/mg}$

6. ESSAIS D'INCORPORATION

6.1. Introduction des précurseurs

Les précurseurs supposés, marqués au ^{14}C (env. 4 mg par expérience) ont été mis en solution dans 4 ml d'eau bidistillée, si nécessaire avec un peu de NaHCO_3 et stérilisés par filtration sur filtre bactériologique Millipore, puis le filtre lavé par 4 ml d'eau bidistillée. La solution du précurseur est introduite stérilement dans les 4 flacons

de culture, à raison de 2 ml par culture, en général en une seule fois, au moment où les mycéliums commencent à se colorer de rose à leur surface inférieure.

6.2. Extraction et traitement des pigments

Les pigments sont extraits des cultures et dosés selon la technique décrite précédemment (p. 65), les mycéliums séchés au dessiccateur sous vide et pesés.

Un échantillon d'environ 20 mg de pigment recristallisé est transformé en son dérivé leuco-peracétylé par traitement à l'anhydride acétique en présence de poudre de Zn et de pyridine. Le dérivé acétylé est purifié par chromatographie sur plaques de SiO_2 (syst. 1) et une recristallisation dans le mélange acide acétique-eau. L'expérience a montré que cette purification est suffisante et des recristallisations supplémentaires n'ont modifié ni le point de fusion, ni la radioactivité spécifique des dérivés acétylés. Un échantillon d'environ 10 mg est pesé exactement et compté par scintillation liquide.

6.3. Détermination des rendements d'incorporation

Le rendement d'incorporation est donné par le rapport:

$$\eta_{\text{inc.}} = \frac{A_{\text{pigment}}}{A_{\text{précurseur}}}$$

où:

$$A_{\text{préc.}} = AS_{\text{préc.}} \cdot P_{\text{préc.}}$$

et

$$A_{\text{pig.}} = \frac{AS_{\text{ac.}} \cdot M_{\text{ac.}}}{M_{\text{pig.}}} \cdot P_{\text{pig.}}$$

A = activité totale (μCi)

AS = activité spécifique ($\mu\text{Ci/mg}$)

P = poids (mg)

M = masse moléculaire

ac. = dérivé acétylé

7. TABLEAUX DES ESSAIS D'INCORPORATION

7.1. PHOENICINE

P R E C U R S E U R				P H O E N I C I N E			Incorporation dans la phoenicine
	Mode d' introduction	μMol	Radioactivité spécifique $\mu\text{Ci}/\text{mMol}$	Radioactivité spécifique $\mu\text{Ci}/\text{mMol}$	Dosée mg	Radioactivité totale μCi	
Acétoacétate de Li	en 1 fois	44	13,9	0,61	197	0,079	0,057
Ac. orsellinique	en 1 fois	29,1	14,2	0,41	169	0,076	0,047
Ac. orsellinique*	en 1 fois	25,8	8,1	0,21	236	0,052	0,045
Ac. orsellinique	en 5 fois**	475,8	8,8	4,19	306	0,343	0,383
Trihydroxytoluène	en 1 fois	27,4	36,7	1,0	149	0,158	0,086
Trihydroxytoluène	en 5 fois**	428	4,0	1,7	276	0,098	0,099
Acide hydroxy- orsellinique	en 1 fois	27,3	55,8	1,52	150	0,027	0,015
Ac. tétrahydroxy- bitolyl- dicarboxylique	en 1 fois	13,8	96,6	1,33	190	0,026	0,018
Tétrahydroxy- bitolyl	en 1 fois	11,2	96,6	1,08	130	0,008	0,004
	en 5 fois**	112,4	10,0	1,12	202	0,004	0,003
Orcinol	en 1 fois	35,8	14,9	0,53	220	0,010	0,008
Orcinol	en 4 fois**	32,1	14,9	0,48	181	0,021	0,014
Orcinol	en 1 fois	96,7	160,4	15,5	42	0,720	0,11
Orcinol	en 4 fois**	131,3	3,9	0,52	188	0,015	0,010
Orcinol	en 5 fois**	483,3	4,6	2,22	266	0,085	0,082
Aldéhyde orsell.	en 5 fois**	525,8	4,6	2,42	258	0,052	0,049
							9,3 %
							11,5
							21,4
							9,1
							8,6
							5,8 ¹
							0,99
							1,3
							0,37
							0,27
							1,5
							2,9
							0,7 ²
							1,9
							3,7
							2,0

Incorporation dans la phoenicine de l'acide orsellinique doublement marqué

Radio-élément étudié	A C I D E O R S E L L I N I Q U E			P H O E N I C I N E		
	Mode d' introduction	Mol	Radioactivité spécifique	Radioactivité totale	Dosée	Radioactivité spécifique totale
¹⁴ C	en 1 fois	25,8	8,1	0,21	236	0,052
³ H			21,35	0,55		0,059
						21,4
						9,3

Rapport des rendements d'incorporation: $^3\text{H}/^{14}\text{C} = 0,43$

Tous les résultats des deux tableaux ci-dessus sont rapportés à 200 ml de culture (4 cultures de 50 ml)

*Précurseur doublement marqué

** Précurseur introduit en 4 ou 5 portions à 2 jours d'intervalle
Expérience terminée 2 jours après la dernière adjonction

1 cf. réf. /57/

2 cf. réf. /18/

7.2. OOSPOREINE

P R E C U R S E U R				O O S P O R E I N E			Incorporation dans l'osporeïne
	Mode d' introduction	μMol	Radioactivité spécifique $\mu\text{Ci}/\text{mMol}$	Radioactivité spécifique $\mu\text{Ci}/\text{mMol}$	Dosée mg	Radioactivité totale μCi	
Acétoacétate de Li	en 1 fois	50	13,9	0,69	69	0,108	3,5 %
Acétoacétate de Li	en 1 fois	38	13,9	0,53	124	0,045	3,4
Ac. orsellinique	en 1 fois	48,3	14,2	0,69	81	0,695	26,7
Ac. orsellinique	en 1 fois	25,8	14,2	0,37	123	0,328	35,7
Trihydroxytoluène	en 1 fois	28,4	36,7	1,04	50	0,400	6,2
Trihydroxytoluène	en 1 fois	32,2	36,7	1,18	115	0,400	12,7
Trihydroxytoluène	en 5 fois**	428	4,0	1,7	244	0,454	21,3 ¹
Acide hydroxy- orsellinique	en 1 fois	19,9	55,8	1,11	67	1,01	19,9
Dihydroxytoluquinone	en 1 fois	24,2	265,9	6,43	56	4,11	11,7
Dihydroxytoluquinone	en 1 fois	27,5	265,9	7,31	129	3,08	17,8
Tétrahydroxy- bitolyl	en 5 fois**	162,4	10,0	1,62	372	0,0022	0,17
Ac. tétrahydroxy- bitolyl- dicarboxylique	en 1 fois	11,4	96,6	1,10	60	0,033	0,59
	en 1 fois	13,0	96,6	1,26	109	0,016	0,45
Phoenicine	en 1 fois	14,6	6,03	0,088	317	0,00048	0,57
Phoenicine	en 1 fois	72,9	6,03	0,44	342	0,0019	0,45
Phoenicine	en 1 fois	145,9	6,03	0,88	322	0,0028	0,34

** Précurseur introduit en 5 fois à 2 jours d'intervalle. Expérience terminée 2 jours après la dernière adjonction
¹ cf. réf. /57/ Tous les résultats sont rapportés à 200 ml de culture (4 cultures de 50 ml)

8. DISCUSSION DES RESULTATS

8.1. Remarques générales

La voie de l'acétate ayant déjà été bien démontrée pour la biosynthèse de l'acide orsellinique (voir introduction), on peut admettre la condensation de deux molécules d'acétoacétate, dont l'incorporation est plus forte que celle de l'acétate. A partir de l'acide orsellinique, intermédiaire certain, le problème se résumait à l'alternative suivante:

1) Couplage au niveau de l'acide orsellinique pour donner l'acide tétrahydroxybitolyl-dicarboxylique (IX) qui par oxydations et décarboxylation successives, est transformé en phoenicine ou en oosporéine

2) Décarboxylation et oxydations de l'acide orsellinique pour donner le tri- ou tétrahydroxytoluène, le couplage des noyaux ayant alors lieu à la fin de la chaîne de réactions.

Les incorporations des précurseurs ont eu lieu dans des cellules intactes. Un facteur important est alors représenté par la perméabilité cellulaire: un précurseur supposé peut être physiologique, mais cependant son incorporation sera mauvaise si son transport à travers les membranes cellulaires est difficile. L'idéal serait évidemment de disposer de préparations acellulaires dans lesquelles les complications représentées par les perméabilités sélectives n'existent plus. En présence de telles préparations, il faut prévoir, ainsi que cela a été démontré dans d'autres cas analogues, que l'incorporation sera d'autant plus forte que l'intermédiaire supposé est plus proche du produit final dans la séquence considérée.

Aussi bien en ce qui concerne la biosynthèse de l'oosporéine que celle de la phoenicine, c'est l'incorporation de l'acide orsellinique qui est la plus importante en présence de cellules intactes. Par contre, l'incorporation des intermédiaires suivants, au lieu d'être plus forte, est plus faible, ce qui est contraire aux prévisions indiquées

ci-dessus et serait explicable pas une perméabilité cellulaire moins favorable

Dans les schémas de biosynthèse proposés ci-après, nous avons cependant considéré comme intermédiaires ceux dont l'incorporation est relativement forte et ce principe, bien que contestable, a constitué la base des schémas de biosynthèse proposés.

En tenant compte de ce qui précède, il reste donc une incertitude. Cependant, plusieurs raisons nous ont amenés à admettre les schémas proposés:

1) Les incorporations des précurseurs que nous avons retenus comme intermédiaires naturels ne sont pas augmentées lorsque ces produits sont introduits dans les cultures en plusieurs fois, c'est à dire dans des conditions favorisant une adaptation du microorganisme au précurseur en question. Ces précurseurs peuvent donc être considérés comme des intermédiaires certains. Or, si l'on consulte les schémas de biosynthèse proposés, on voit qu'il n'est pas possible d'inclure dans ces schémas les produits faiblement incorporés, en particulier l'acide tétrahydroxybitolyl-dicarboxylique, sans devoir admettre une voie de biosynthèse complètement différente, voie qui excluerait à son tour des produits considérés pour les raisons exposées ci-dessus comme des intermédiaires certains

2) Des substances chimiquement très voisines de l'acide tétrahydroxybitolyl-dicarboxylique telles que l'acide orsellinique ou l'acide hydroxyorsellinique sont très bien incorporées

3) On pourrait expliquer la faible incorporation de l'acide hydroxyorsellinique dans la phoenicine par des difficultés de transport, mais ce produit est très bien incorporé dans l'oosporéine, et vu les nombreuses similitudes qui existent entre les deux microorganismes, cela reste improbable.

8.2. Biosynthèse de la phoenicine

Le tableau des résultats des incorporations montre que ni l'acide tétrahydroxybitolyl-dicarboxylique, ni le tétrahydroxybitolyl

ne sont bien incorporés (% d'incorp. < 1). Au contraire, l'incorporation du 2,3,5-trihydroxytoluène est relativement importante et, surtout, n'est pas augmentée lorsque le précurseur est introduit dans des conditions favorisant l'adaptation du microorganisme. Ce produit peut donc être considéré comme un intermédiaire probable dans la biosynthèse de la phoenicine, ce qui élimine la première des deux voies proposées ci-dessus.

La transformation de l'acide orsellinique en 2,3,5-trihydroxytoluène a été étudiée plus en détail afin d'en déterminer le mécanisme exact. Cette transformation peut être envisagée de trois manières:

- 1) Oxydation de l'acide orsellinique en acide hydroxyorsellinique, puis décarboxylation
- 2) Décarboxylation de l'acide orsellinique en orcinol, puis oxydation
- 3) Décarboxylation oxydante de l'acide orsellinique, qui serait transformé en trihydroxytoluène en un seul stade.

Le tableau des essais d'incorporation montre que l'orcinol n'est pas incorporé, une légère adaptation se produisant si on l'introduit à petites doses, et que l'acide hydroxyorsellinique ne l'est pas non plus. Il faut donc éliminer les deux premières propositions et admettre la décarboxylation oxydante. Afin de mettre en évidence cette réaction, nous avons procédé à un essai d'incorporation de l'acide orsellinique doublement marqué, au ^{14}C et au tritium, sur le noyau benzénique afin de déterminer le rapport des incorporations des deux radioéléments. Le rapport attendu pouvait être un des suivants:

- o pour la proposition 1)
- o,25 pour la proposition 2)
- o,5 pour la proposition 3) (résultat: o,43)

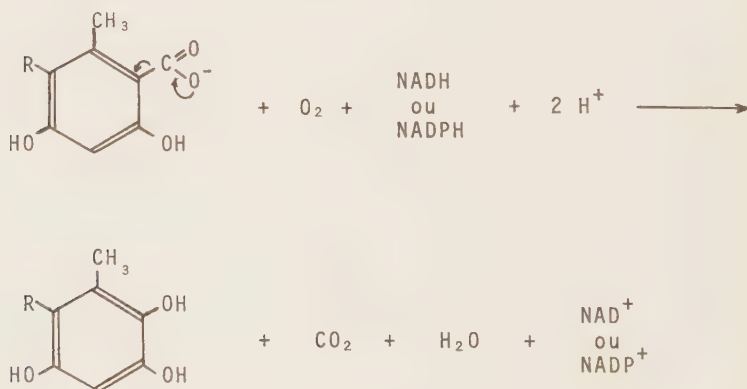
Le résultat de cet essai confirme donc l'existence de cette réaction (proposition 3).

On peut penser que la réaction s'effectue par couplage entre une réaction de décarboxylation et une réaction d'hydroxylation.

Les décarboxylations d'acides aromatiques sont courantes chez les microorganismes. Nous ne retiendrons comme système enzymatique que l'orsellinate décarboxylase étudiée par Petterson /68/, qui ne semble pas nécessiter de cofacteur particulier tel que le phosphate de pyridoxal par exemple.

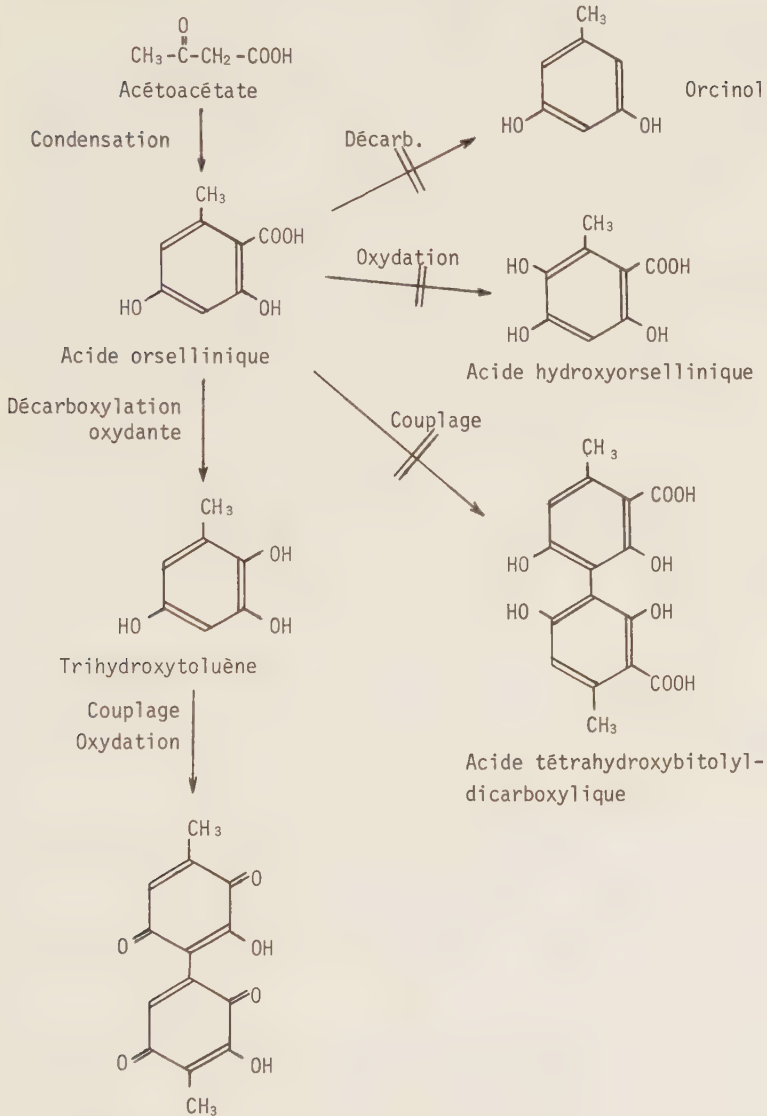
On a montré que dans beaucoup d'hydroxylations de noyaux aromatiques interviennent des oxydases à fonction mixte qui font intervenir à la fois l'oxygène moléculaire et le NADH ou le NADPH. C'est ainsi que se forment, pour les substances à caractère aromatique, la tyrosine à partir de la phénylalanine, le 5-hydroxytryptophane à partir du tryptophane ou encore une substance non-physiologique: la p-hydroxyacétanilide à partir de l'acétanilide.

Nos observations impliqueraient un système enzymatique différent, où décarboxylation et hydroxylation se feraient en une seule étape sur l'enzyme selon le schéma du type suivant:



En conclusion, on peut admettre pour la biosynthèse de la phoenicine le schémaproposé à la page suivante.

Schéma de biosynthèse de la phoenicine



8.3. Biosynthèse de l'oosporéine

Les schémas de biosynthèse de l'oosporéine à envisager sont les mêmes que pour la phoenicine, avec une oxydation supplémentaire. Il y a donc deux oxydations, une décarboxylation et un couplage de noyaux et l'ordre dans lequel ces réactions prennent place peut être choisi parmi plusieurs possibilités. Comme dans le cas de la phoenicine, la faible incorporation de l'acide tétrahydroxybitolyl-dicarboxylique et de du tétrahydroxybitolyl, de même ici que de la phoenicine elle-même nous permet d'éliminer les voies qui passent par ces intermédiaires et de placer le couplage des noyaux benzéniques comme dernier stade.

Le couplage n'ayant donc lieu ni au niveau de l'acide orsellinique (ce qui supposerait la formation d'acide tétrahydroxybitolyl-dicarboxylique), ni de l'orcinol (tétrahydroxybitolyl), ni du trihydroxytoluène (phoenicine), il nous restait à étudier la transformation de l'acide orsellinique en tétrahydroxytoluène qui apparaît comme le dernier intermédiaire à un seul noyau.

La voie de biosynthèse semble donc parallèle à celle de la phoenicine et le problème réside dans l'emplacement à attribuer à l'oxydation supplémentaire. Deux possibilités sont offertes:

1) Oxydation de l'acide orsellinique en acide hydroxyorsellinique, puis décarboxylation et oxydation de ce dernier en un ou deux stades pour donner le tétrahydroxytoluène

2) Formation du trihydroxytoluène comme dans le cas de la phoenicine et oxydation de celui-ci.

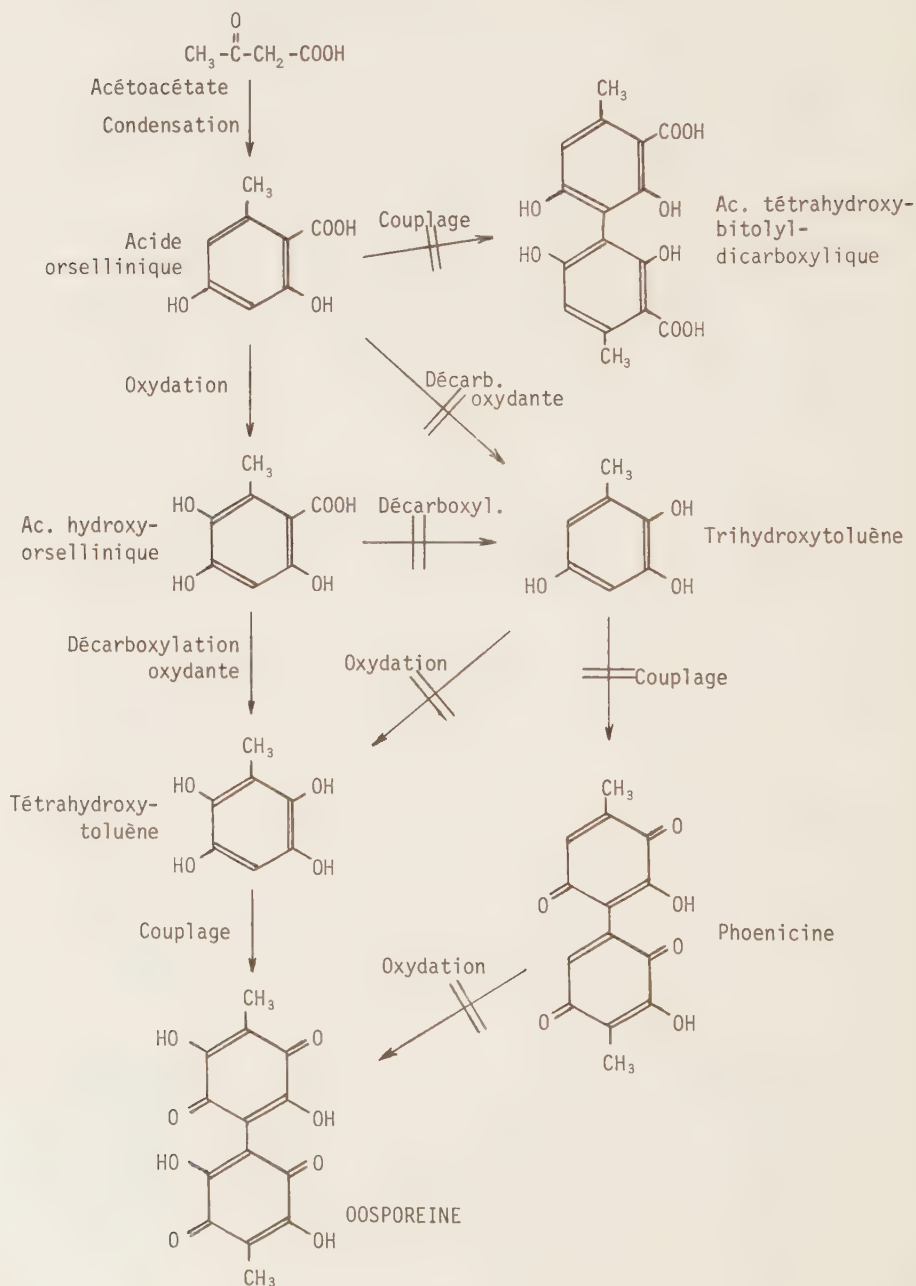
L'incorporation très forte de l'acide hydroxyorsellinique laisse supposer que c'est lui qui fait partie de la voie naturelle de biosynthèse. Ceci exclut donc le trihydroxytoluène comme intermédiaire et son incorporation relativement importante peut s'expliquer par un phénomène d'adaptation. En effet, si on administre ce précurseur en plusieurs portions, on constate une forte augmentation, phénomène qui

ne se produit pas chez la phoenicine, au contraire.

On pourrait également admettre le trihydroxytoluène comme intermédiaire entre l'acide hydroxyorsellinique et le tétrahydroxytoluène. Mais les raisons exposées ci-dessus, de même que les similitudes qui existent entre les voies de biosynthèse des deux pigments nous ont ammenés à préférer une décarboxylation oxydante, bien qu'aucune preuve formelle n'ait pu être apportée à cette affirmation.

On peut donc admettre pour la biosynthèse de l'oosporéine le schéma proposé à la page suivante.

Schéma de biosynthèse de l'oosporéine



B I B L I O G R A P H I E

- /1/ E.A.H. Friedheim, *Helv. Chim. Acta* 21- 1464 (1938)
- /2/ Th. Posternak, *Comptes rendus Soc. Phys. Hist. Nat. (Genève)* 56-28 (1939)
- /3/ Th. Posternak, *ibid.* 55-63 (1938)
- /4/ Th. Posternak, *Helv. Chim. Acta* 21-1326 (1938)
- /5/ Th. Posternak, H.W. Ruelius, J. Tcherniak, *Helv. Chim. Acta* 26-2031 (1943)
- /6/ H. Musso, H. Beeken, *Ber.* 92-1416 (1959)
- /7/ F. Kögl, G.C. van Wessem, *Rec. Trav. Chim. Pays-Bas*, 63-5 (1944)
- /8/ G. Lloyd, A. Robertson, G.B. Sankey, W.B. Whalley, *J. Chem. Soc.* 1955-2163
- /9/ A.J. Birch, R.I. Fryer, *Austr. J. Chem.* 22-1319 (1969)
- /10/ P.V. Divekar, R.H. Haskins, L.C. Vining, *Can. J. Chem.* 37-2097 (1965)
- /11/ H. Takeshita, M. Anchel, *Science* 147-152 (1965)
- /12/ J. Smith, R.H. Thomson, *Tetrahedron* 10-148 (1960)
- /13/ S.H. El Basyouni, L.C. Vining, *Can. J. Biochem.* 44-557 (1966)
- /14/ F. Dallaker, Z. Damo, G. Löhnert, *Ang. Chem. Int. Ed.* 10-281 (1971)
- /15/ K. Chandrasenan, S. Neelakantan, T.R. Sheshadri, *Bull. Nat. Inst. Sci. India*, 28-92 (1965) cf. *Chem. Abstr.* 66-26145p (1967)
- /16/ P.C. Beaumont, R.L. Edwards, *J. Chem. Soc.* 1971-2582
- /17/ E. Charollais, S. Fliszar, Th. Posternak, *Arch. Sci. Genève* 16-474 (1963)

- /18/ S. Fliszar, Thèse No 1377, Univ. Genève (1965)
- /19/ J. F. W. Mc Omie, M.L. Watts, D.E. West, Tetrahedron 24-2289 (1968)
- /20/ H. Musso, H.G. Matthies, Ber. 94-356 (1961)
- /21/ R.A. Morton, Biochemistry of Quinones p. 28 (1965) Acad. Press.
- /22/ W. Flaig, J.C. Salfeld, E. Baume, Ann. 618-117 (1958)
- /23/ H. Musso, D. Borman, Ber. 98-2274 (1965)
- /24/ M. Martynoff, Bull. Soc. Chim. France 1949-258
- /25/ H. Hartmann, E. Lorenz, Z. Naturforsch. 7a-360 (1952)
- /26/ J.W. Emsley, J. Feeney, L.H. Sutcliffe
High Resolution Nuclear Magnetic Resonance Spectroscopy,
Pergamon Press (1966) 750-777 Liste de références.
- /27/ R.W. Taft, J. Am. Chem. Soc. 79-1045 (1957)
- /28/ P.L. Clorio, B.P. Dailey, J. Am. Chem. Soc. 78-3044 (1956)
- /29/ D.H. Mc Daniel, H.C. Brown, J. Org. Chem. 23-420 (1958)
- /30/ J.G. Traynham, G.A. Knesel, J. Org. Chem. 31-3350 (1966)
- /31/ M.T. Tribble, J.G. Traynham, J. Am. Chem. Soc. 91-381 & 384 (1969)
- /32/ L.M. Hall, Biochem. Prep. 10-5
- /33/ R. Adams, I. Levine, J. Am. Chem. Soc. 45-2373 (1923)
- /34/ J. Santesson, A. Chem. Scand. 24-3373 (1970)
- /35/ R.A. Kloss, O.A. Clayton, J. Org. Chem. 30-3566 (1965)
- /36/ J.H. Birkinshaw, A. Gowlland, Biochem J. 84-342 (1962)
- /37/ N.B. Dean, W.B. Whalley, J. Chem. Soc. 1954-4639
- /38/ F. Henrich, Monatshefte für Chemie 18-143 (1897)
- /39/ Y. Asahina, F. Fuzikawa, Ber. 65-59 (1932)
- /40/ H.W. Dorn, W.H. Warren, J.L. Bullock, J. Am. Chem. Soc. 61-144 (1939)

- /41/ F. Weygand, K. Vogelbach, K. Zimmermann, Ber. 80-391 (1947)
- /42/ Hiraiwa, J. Pharm. Soc. Japan 60-569 (1940)
- /43/ Y. Asahina, T. Kusaka, Bull. Chem. Soc. Japan 17-152 (1942)
- /44/ F. Bennington, R.D. Morin, L.C. Clark, J. Org. Chem. 20-106 (1955)
- /45/ D. v. Hagen, Th. Zinke, Ber. 16-1558 (1883)
- /46/ W.K. Anslow, H. Raistrick, J. Chem. Soc. 1939-1446
- /47/ G. Petterson, A. Chem. Scand. 17-1771 (1963)
- /48/ G. Petterson, J. of Chromatography 12-352 (1963)
- /49/ F. Fichter, Ann. 361-401 (1908)
- /50/ Organic Synthesis, Coll. vol. IV, 547
- /51/ Houben-Weil, Methoden der Organischen Chemie 5/4 582 (1960)
- /52/ J. Stenhouse, Ann. 171-310 (1874)
- /53/ L.J. Andrews, J. Am. Chem. Soc. 79-1414 (1957)
- /54/ A. Robertson, R. Robinson, J. Chem. Soc. 1927-2199
- /55/ Houben-Weil, Methoden der Organischen Chemie, 11/1 864 (196)
- /56/ H.L. Finkbeiner, M. Stiles, J. Am. Chem. Soc. 85-616 (1963)
- /57/ E. Charollais, Th. Posternak, Comptes rendus SPHN (Genève) 5-138 (1970)
- /58/ G. Petterson, A. Chem. Scand. 18-1202 (1964)
- /59/ R.F. Curtis, P.C. Morris, C.H. Hassal, J.P. Levi, Biochem. J. 90-43 (1964)
- /60/ K. Mosbach, Z. Naturforschung, 14b-69 (1959)
- /61/ G. Petterson, A. Chem. Scand. 19-543 (1965)
- /62/ G. Petterson, A. Chem. Scand. 18-335 (1964)

- /63/ H. Brockmann, M. Muxfeld, Ber. 91-1242 (1958)
- /64/ P. Simonart, H. Verachtet, Bull. Soc. Chim. Biol. 48-943
(1966), 49-543 (1967)
- /65/ G. Read, D.W.S. Westlake, L.C. Vining, Can. J. Biochem.
47-1071 (1969)
- /66/ T. Curtin, G. Fitzgerald, J. Reilly, Biochem. J. 34-1605
(1940)
- /67/ G.A. Bray, Anal. Biochem. 1-279 (1960)
- /68/ G. Petterson, A. Chem. Scand. 19-2019 (1965)

